บทที่ 4

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

4.1 สารเคมี

(+)เมนทอล ($C_{10}H_{20}O$), (-)เมนทอล, (±)เมนทอล, และไตรอะซิติน ($C_9H_{14}O_6$) มีความบรสุทธิ์ 99%, (-)เมนทิลอะซิเตต ($C_{12}H_{22}O_2$) มีความบริสุทธิ์ 98% และ กรดบิส-2-เอทิลเฮกซิล ไฮโดรเจน ฟอสเฟต ($C_{16}H_{35}PO_4$) มีความบริสุทธิ์ 97% จากบริษัท Aldrich chemicals company, USA.

โปตัชเซียม ได-ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (KH_2PO_4), กรดไฮโดรคลอริก (HCl), และโซเดียม ไฮดรอกไซด์ (NaOH) มีความบริสุทธิ์ระดับห้องปฏิบัติการ (lab grade) จากบริษัท Merck, Germany

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และ ไอโซออกเทน (C_8H_{18}) มีความบริสุทธิ์ระดับห้องปฏิบัติการ จากบริษัท Ajax chemicals, Australia.

ไลเปสจาก Candida cylindracea (triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) จากบริษัท Aldrich chemicals company, USA.

4.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

-อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Julabo of Labortechnik, จากบริษัท GMBH, Germany.

-สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น 220 A จากบริษัท Hitachi, Japan.

-แกส-โครมาโตรกราฟี รุ่น 14-A จากบริษัท Shimadzu, Japan.

-อินทีเกรเตอร์ รุ่น 6A จากบริษัท Shimadzu, Japan.

-เครื่องระเหยแบบหมุน

-เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น 671 จากบริษัท Jenco electronics, Taiwan.

4.3 วิธีการทดลอง

การทดลองสำหรับปฏิกิริยาการแยกของเรซิมิกเมนทอลโดยไลเปสในระบบรีเวิร์สไมเซลล์สามารถแบ่งได้เป็นสามส่วน คือ ส่วนแรกเป็นการทดลองเบื้องต้น ซึ่งจะกล่าวถึงการเตรียมสารลดแรงตึงผิว SDEHP และการเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ส่วนที่สองเป็นการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการละลายของไลเปส และในส่วนสุดท้ายจะศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันของเรซิมิกเมนทอลกับไตรอะซิติน ในระบบรีเวิร์สไมเซลล์

4.3.1 การทดลองเบื้องต้น

4.3.1.1 การเตรียมสารลดแรงตึงผิว (sodium bis (2-ethylhexyl) phosphate, SDEHP)

กรดบิส-2-เอทิลเฮกซิล ฟอสฟอริก (bis-2-ethylhexyl phosphoric acid, DEHPA) ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการล้างกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แล้วแยก DEHPA ออกโดยใช้กรวยแยกแล้วนำ DEHPA มาละลายในเมทธานอล หลังจากนั้น

เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทธานอลเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในอัตราส่วนโดยปริมาตรของ DEHPA ในเมทธานอลต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทธานอล เท่ากับ 1 ต่อ 1 แล้วทำการระเหยเอาเมทธานอลออก โดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุน (rotating evaporator) จึงได้เป็นผลึกของ SDEHP ซึ่งจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

4.3.1.2 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.8 ถึง 8.0 สามารถเตรียมโดยการผสมสารละลาย 0.2 โมลาร์ของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 25 มิลลิลิตร กับ 0.2 โมลาร์ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ในปริมาณที่ต่างกันตามค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต้องการตามตารางที่ 4.1 แล้วละลายด้วยน้ำให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้ไปทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างจนได้ตามต้องการด้วยกรดหรือเบสเข้มข้น

ตารางที่ 4.1 ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใส่ในบัฟเฟอร์ตามค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต้องการ

ความเป็นกรด-ด่าง	5.8	6.0	6.2	6.4	6.6	6.8
ปริมาตรของสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.05 M	1.86	2.85	4.30	6.30	8.90	11.83

ความเป็นกรด-ด่าง	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0
ปริมาตรของสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.05 M	14.82	17.50	19.75	21.40	22.60	23.40

4.3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการละลายของไลเปสในระบบรีเวิร์สไมเซลล์

การทดลองการละลายของไลเปสจาก Candida cylindracea ในระบบรีเวิร์สไมเซลล์สามารถทำได้โดยวิธีการถ่ายเทมวลข้ามเฟส (phase transfer) ของไลเปสจากเฟสของสารละลายน้ำไปยังเฟสของรีเวิร์สไมเซลล์ ในการทดลองนี้เฟสรีเวิร์สไมเซลล์จะประกอบด้วยสารละลายของ SDEHP ในไอโซออกเทนที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.2 โมลาร์ ตามลำดับ ส่วนในเฟสของสารละลายน้ำประกอบด้วยไลเปสเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7 (ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, และ 0.2 โมลาร์) และโซเดียมคลอไรด์ (ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, และ 0.2 โมลาร์) สัดส่วนโดยปริมาตรของทั้งสองเฟส คือ 1 ต่อ 1 หลังจากปล่อยให้สารละลายทั้งสองเฟสได้สัมผัสกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง(เพื่อให้ระบบถึงสมดุล) ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) จึงนำไปทำการแยกเฟสด้วยกรวยแยก แล้วนำเฟสของสารละลายบัฟเฟอร์ไปทดสอบหาความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสหลังสมดุลด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ผลการทดลองที่แสดงเป็นผลจากค่าเฉลี่ยของการวิเคราะห์ซ้ำสองครั้งจากตัวอย่างเดียวกัน ส่วนความเข้มข้นของไลเปสในตัวทำละลายอินทรีย์สามารถหาได้โดยการทำสมดุลมวล (mass balance) สำหรับการทดลองนี้สามารถหาค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง (the coefficient of variation) ของชุดตัวอย่างที่ทำการทดลองซ้ำกันสามครั้งเป็น $\pm$ 7.43%

ความสามารถในการละลายของไลเปส (% solubility) สามารถหาจากสัดส่วนโดยน้ำหนักของไลเปสในตัวทำละลายอินทรีย์ต่อปริมาณของไลเปสทั้งหมดในระบบ ซึ่งตัวแปรที่มีผลต่อการละลายของไลเปส คือ ความเข้มข้นของ SDEHP, โซเดียมคลอไรด์, และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

4.3.3การหาสภาวะของตัวแปรที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน

การเตรียมสารละลายรีเวิร์สไมเซลล์เตรียมโดยใช้วิธีการฉีด (injection) สารละลายของไลเปสที่อยู่ในสารละลายของ 0.1 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7, ความเข้มข้นเป็น 0.05 โมลาร์) ลงในปริมาตร 10 มิลลิลิตรของสารละลายที่เหมาะสมของ SDEHP, เรซิมิกเมนทอล, และไตรอะซิตินในไอโซออกเทน แล้วเขย่าเบาๆ ด้วยมือจนได้สารละลายใส ไม่มีสี ไลเปสที่ใช้ในการทดลองจะกำหนดให้มีความเข้มข้นรวมคงที่ที่ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณน้ำในไมเซลล์จะเปลี่ยนไปตามค่า W_0 สารตัวอย่างที่เก็บตามช่วงเวลาของการทดลองจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยใช้วิธีแกส-โครมาโตรกราฟี (gas chromatography) (ดูสภาวะของการใช้เครื่องได้ในหัวข้อ 4.4.2 ซึ่งจะทำการวิเคราะห์ด้วยแกส-โครมาโตรกราฟีจำนวนสองครั้งต่อสารตัวอย่างหนึ่งชุด โดยค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นหาโดยการใช้ค่าความชันที่ได้จากสมการเส้นตรงแบบถดถอย (linear regression) ระหว่างความเข้มข้นของผลผลิตที่ได้กับเวลา สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างของผลการทดลองที่ได้จากการทำทดลองซ้ำสี่ครั้งมีค่า $\pm$10.5%

ตัวแปรทั้งหมดที่ทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน จะประกอบด้วย อัตส่วนเชิงโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (W_0), ความเข้มข้นของเรซิมิกเมนทอล และไตรอะซิติน, ความเป็นกรด-ด่างของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และอุณหภูมิ โดยการทดลองจะนำเอาทฤษฎีการออกแบบการทดลอง (experimental design) มาใช้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของตัวแปรทั้งห้าต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันโดยเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ โดยใช้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะ (specific rate, Y) เป็นเกณฑ์ในการพิจารณา ซึ่งสามารถดูวิธีการออกแบบการทดลองได้ตามภาคผนวก ข1

4.4 การวิเคราะห์

ในงานวิจัยนี้จะใช้สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ในการหาความเข้มข้นของไลเปสในสารละลาย และจะใช้แกสโครมาโตกราฟีในการหาปริมาณของผลผลิต (เมนทิลอะซิเตต) ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา

4.4.1 การวิเคราะห์โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

ความเข้มข้นของไลเปสในสารละลายสามารถหาได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารละลายที่มีไลเปสละลายอยู่ โดยจะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร การวัดค่าจากเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ รุ่น 220A จากบริษัท Hitachi, Japan. ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง (the coefficient of the variation) ของผลการวิเคราะห์ซ้ำสามครั้งจากตัวอย่างเดียวกันคือ $\pm$0.23%

4.4.2 การวิเคราะห์โดยใช้แกสโครมาโตกราฟี

การวิเคราะห์โดยใช้วิธีแกสโครมาโตกราฟีสามารถทำได้โดยการเก็บสารละลายตัวอย่างมา 0.2 มิลลิลิตร แล้วผสมกับสารละลายมาตรฐานอินเทอร์นอล (internal standard) จำนวน 20 ไมโครลิตร (โดยใช้สัดส่วนของอะซิโตนต่อไอโซออกเทนเป็น 0.1 ต่อ 10) หลังจากนั้นจึงฉีดสารละลายดังกล่าวจำนวน 1 ไมโครลิตรเข้าวิเคราะห์ในเครื่องแกสโครมาโตกราฟี

แกสโครมาโตกราฟีที่ใช้เป็นของบริษัท Shimadzu รุ่น 14-A มีดีเทคเตอร์ (detector) สองแบบในเครื่องเดียวกัน คือ แบบเฟรม ไอโอไนส์ ดีเทคเตอร์ (FID = flame ionization detector) และแบบเทมเพอเรเจอร์ คอนดัคติวิตี้ ดีเทคเตอร์ (TCD = temperature conductivity detector) สำหรับในงานวิจัยนี้จะใช้แบบ FID

คอลัมน์ที่ใช้เป็นคอลัมน์แก้ว มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2 มิลลิเมตร, ยาว 2 เมตร สิ่งที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์จะเป็น GP 0.3% Carbowax 20M on 80/100 Carbopack C

(Supelco, Bellefonte, PA) สารตัวพาที่นำเอาสารเข้าไปในคอลัมน์คือแกสไนโตรเจน โดยจะกำหนดอัตราการไหลของไนโตรเจนเป็น 40 มิลลิลิตรต่อนาที การตั้งโปรแกรมของอุณหภูมิจะกำหนดให้อุณหภูมิภายในตู้อบ (oven) มีการเปลี่ยนแปลงจาก 150 องศาเซลเซียส ไปเป็น 220 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเปลี่ยนแปลงคือ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที, อุณหภูมิที่อินเจคเตอร์ และดีเทคเตอร์ จะกำหนดไว้ที่ 240 และ 250 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง (the coefficient of the variation) ของผลการวิเคราะห์ซ้ำสามครั้งจากตัวอย่างเดียวกันคือ $\pm$10.24%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย