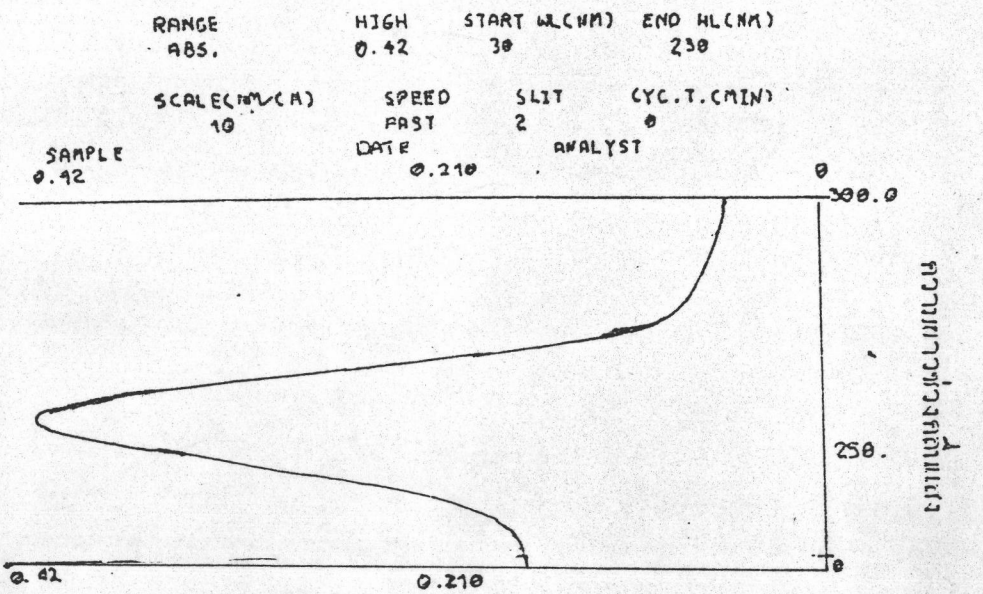
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

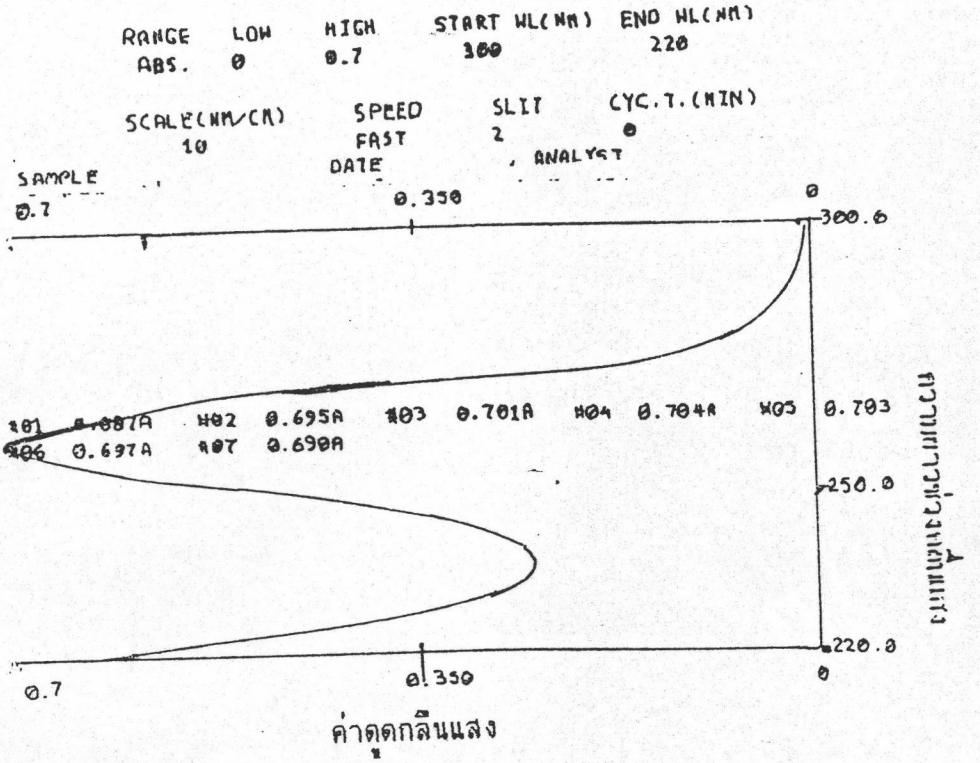
4.1 ผลการทดลองเรื่องวิธีการหาปริมาณนิโคติน และกรดนิโคตินิก

จากการทดลองการหาค่าดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตของนิโคติน และกรดนิโคตินิกที่ได้จากการนำเอากรดนิโคตินิก หรือนิโคตินไปทำให้เจือจางในน้ำ และทำการวัดด้วยอัลตร้าไวโอเลตสเปกโตรมิเตอร์ของบริษัท Shimadzu จะได้ว่า ความยาวคลื่นของค่าดูดกลืนแสงของนิโคติน คือ 259 นาโนเมตร ดังรูปที่ 4.1 ส่วนความยาวคลื่นของค่าดูดกลืนแสงของกรดนิโคตินิก คือ 261 นาโนเมตรดังรูปที่ 4.2



ค่าดูดกลืนแสง

รูปที่ 4.1 UV.สเปกตรัมของนิโคติน



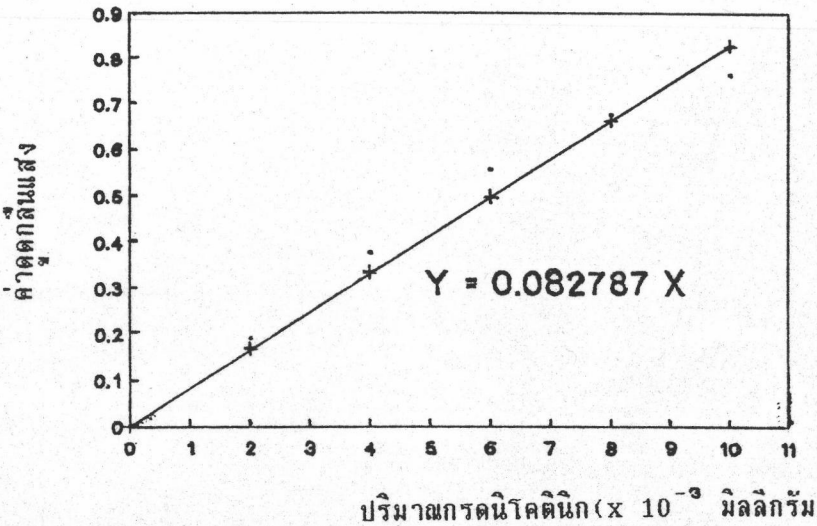
ค่าดูดกลืนแสง

รูปที่ 4.2 UV.สเปกตรัมของกรดนิโคตินิก

และจะได้สมการความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่าดูดกลืนแสง และปริมาณความเข้มข้นแปรผันของสารละลายนิโคตินิกดังในสมการที่ 3 และนิโคตินดังในสมการที่ 4

4.1.1 สมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแปรผัน กับค่าดูดกลืนแสงของกรดนิโคตินิก(ดูในภาคผนวก ฉ.1 หน้าที่ 145)ที่ความยาวช่วงคลื่น 261 นาโนเมตร ซึ่งสามารถเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ได้ดังรูปที่ 4.3

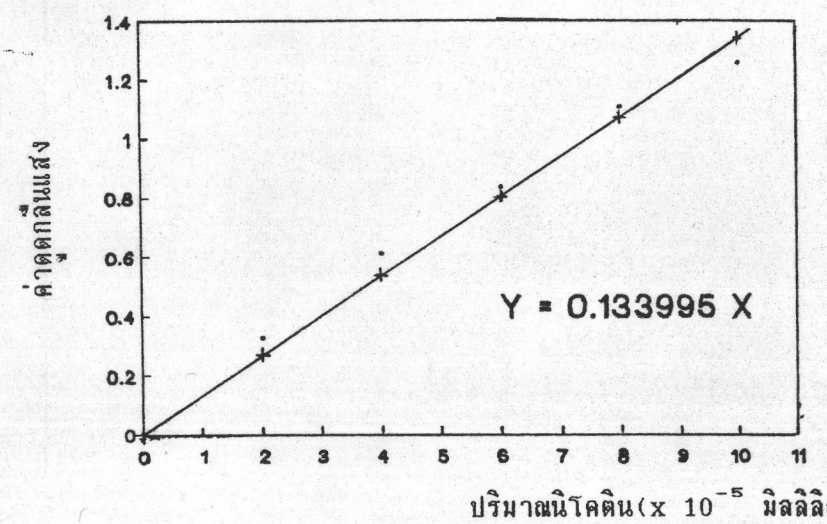
ค่าดูดกลืนแสง(OD.) = 0.082787(ความเข้มข้นของนิโคตินิก(10^{-3} มิลลิกรัม)) (3)



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดนิโคตินิก

4.1.2 สมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแปรผัน กับค่าดูดกลืนแสงของนิโคตินที่(ดูในภาคผนวก ฉ.2 หน้าที่ 146)ความยาวช่วงคลื่น 259 นาโนเมตร ได้ดังรูปที่ 4.4

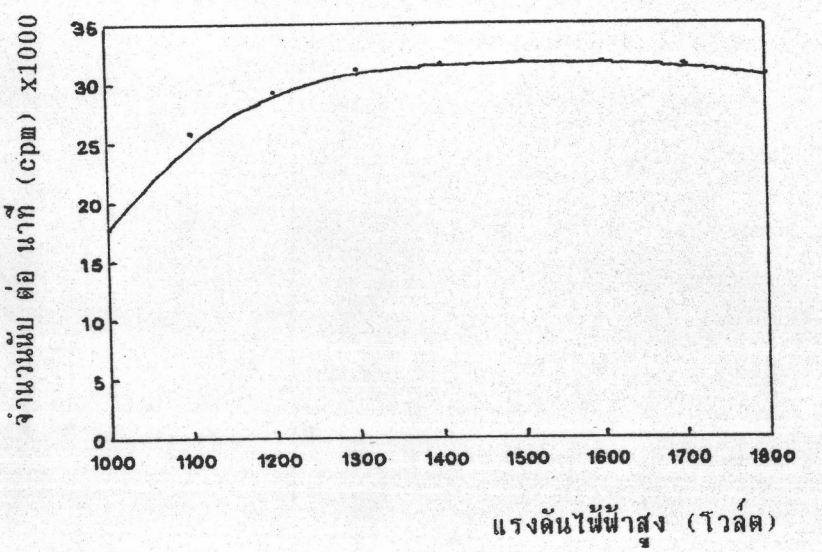
ค่าดูดกลืนแสง(OD.) = 0.133995(ความเข้มข้นของนิโคติน(10^{-5} มิลลิลิตร)) (4)



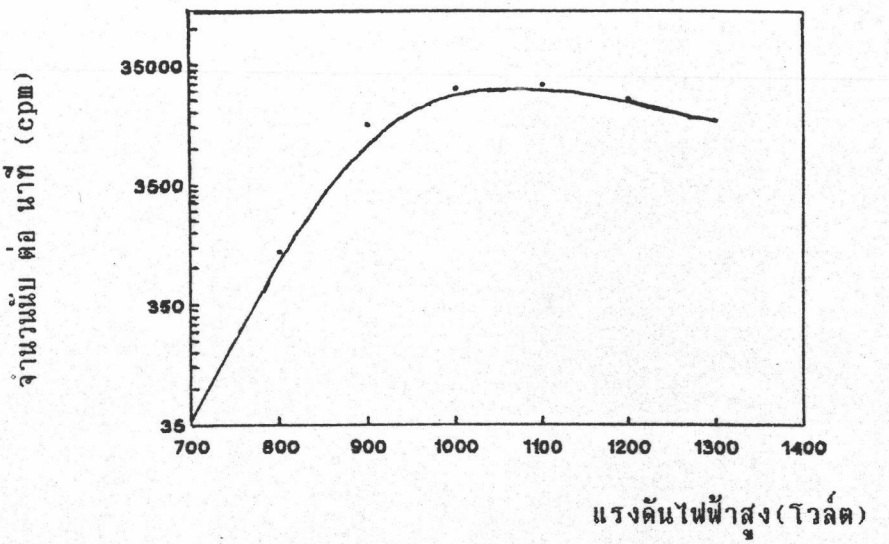
รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสง กับความเข้มข้นของนิโคติน

4.2 ผลการทดลองเรื่องวิธีการหาพลาโท และไฟฟ้าแรงสูงเหมาะสมของเครื่องนับวัดรังสี ลิควิดซินทิลเลชัน

ในการทำทดลองนับวัดรังสีต้นกำเนิดรังสี H-3 มาตรฐานและ C-14 มาตราฐาน ด้วยเครื่องวัดลิควิดซินทิลเลชันจะทำการหาพลาโทและจุดทำงาน ณไฟฟ้าแรงสูงเหมาะสม(Optimum High Voltage) สำหรับ H-3 เมื่อทำการวัดด้วยลิควิดซินทิลเลชัน(LSC) ณ ค่าขีดเริ่มเปลี่ยน (threshold) 425 โวล์ต ,หน้าต่าง(window) 1000 โวล์ต และอัตราการขยาย(gain) เป็น 10 เพื่อขยายขนาดของยอด(peak)ตามทฤษฎีเกี่ยวกับเบต้าสเปกตรัม(Beta spectrum) จะได้ช่วงพลาโท 1400-1600 โวลต์ และค่าไฟฟ้าแรงสูงเหมาะสม 1500 โวลต์(ดูในภาคผนวก ฉ.3 หน้าที่ 147) ดังรูปที่ 4.5 ส่วนเมื่อทดลองกับต้นกำเนิดรังสี C-14 เมื่อทำการวัดด้วยลิควิดซินทิลเลชัน(LSC) ณ ค่าขีดเริ่มเปลี่ยน 240 โวล์ต และหน้าต่าง 1000 โวล์ต อัตราการขยายเป็น 1 จะได้ช่วงพลาโต 900-1200 โวลต์ และค่าไฟฟ้าแรงสูงเหมาะสม 1100 โวลต์(ดูในภาคผนวก ฉ.4 หน้าที่ 148)ดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.5 กราฟพลาโทของ H-3



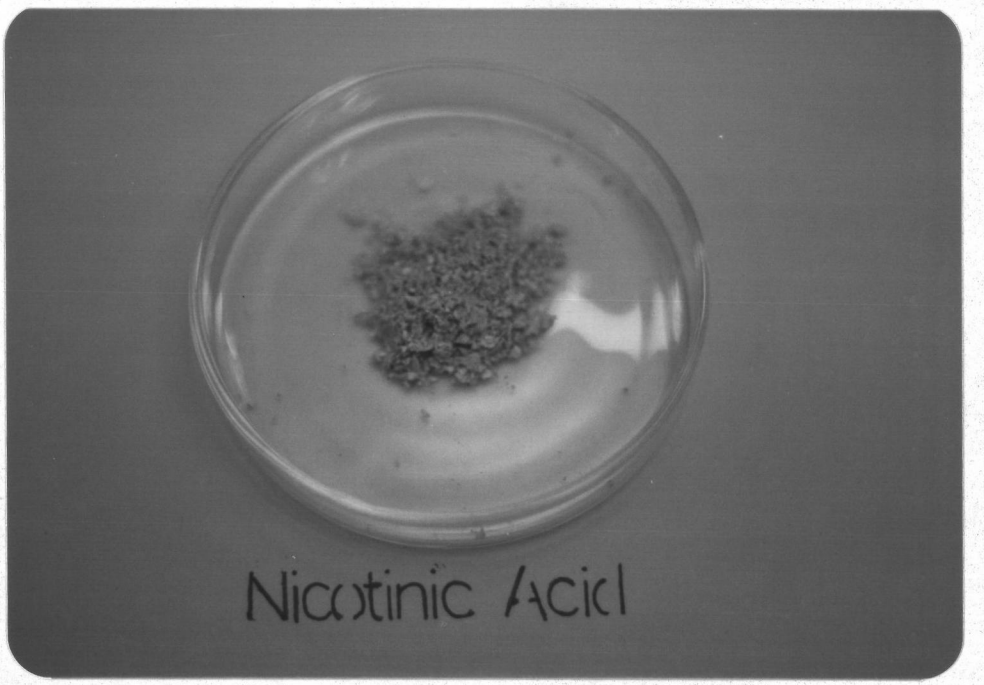
รูปที่ 4.6 กราฟพลาโทของ C-14

4.3 <u>ผลการทดลองเรื่องวิธีการสังเคราะห์นิโคตินิกและกรดนิโคตินิกรังสี</u>

4.3.1 การสังเคราะห์กรดนิโคตินิก C-14

จากการสังเคราะห์กรดนิโคตินิก โดยใช้วิธีการของ Drawson และคณะ (13) นิโคตินนามีดไม่ติดฉลาก 10 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ร้อนพร้อมกับถ่านกัมมันต์ 0.2 กรัม และกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 เติมเบนซามีด(ทำหน้าที่เป็นพาหะ) 10 กรัม ระเหยเอาแอลกอฮอล์ได้สารประกอบอามีด 18.9 กรัม นำไปรีฟลักซ์ด้วย 10% NaOH 285 ซีซี. 2 ชั่วโมง พีเอชหลังการรีฟลักซ์ 10 แสดงว่าเกิดการไฮโดรไซด์อามีดกลายเป็นสารละลายกรด ปรับพีเอชสารละลายให้น้อยกว่า 1 ด้วยกรดHClเข้มข้น และทำการสกัดด้วยอีเทอร์ นำสารละลายชั้นน้ำสกัดด้วยอีเทอร์ที่พีเอช 3 และตกผลึกในแอลกอฮอล์และน้ำ ได้สารประกอบกรดสีเทาแกมขาว 6.48 กรัม และนำมาทำปฏิกริยาเอสเทอร์กับไดเอโซมีเทน(diazomethane)ตามภาคผนวก จ กำจัดอีเทอร์ออกได้สารละลายในรูปน้ำมันสีเหลือง นำไปรีฟลักซ์ด้วย NH_4OH เข้มข้น 100 ซีซี. 2 ชั่วโมง ได้สารละลายกรดที่พีเอช 12 และเมื่อลดปริมตรได้สารละลายสีน้ำตาล นำไปรีฟลักซ์ด้วย 4N NaOH 150 ซีซี นาน 2 ชั่วโมงได้สารละลายสีน้ำตาลพีเอช 12 นำไปสกัดด้วยอีเทอร์

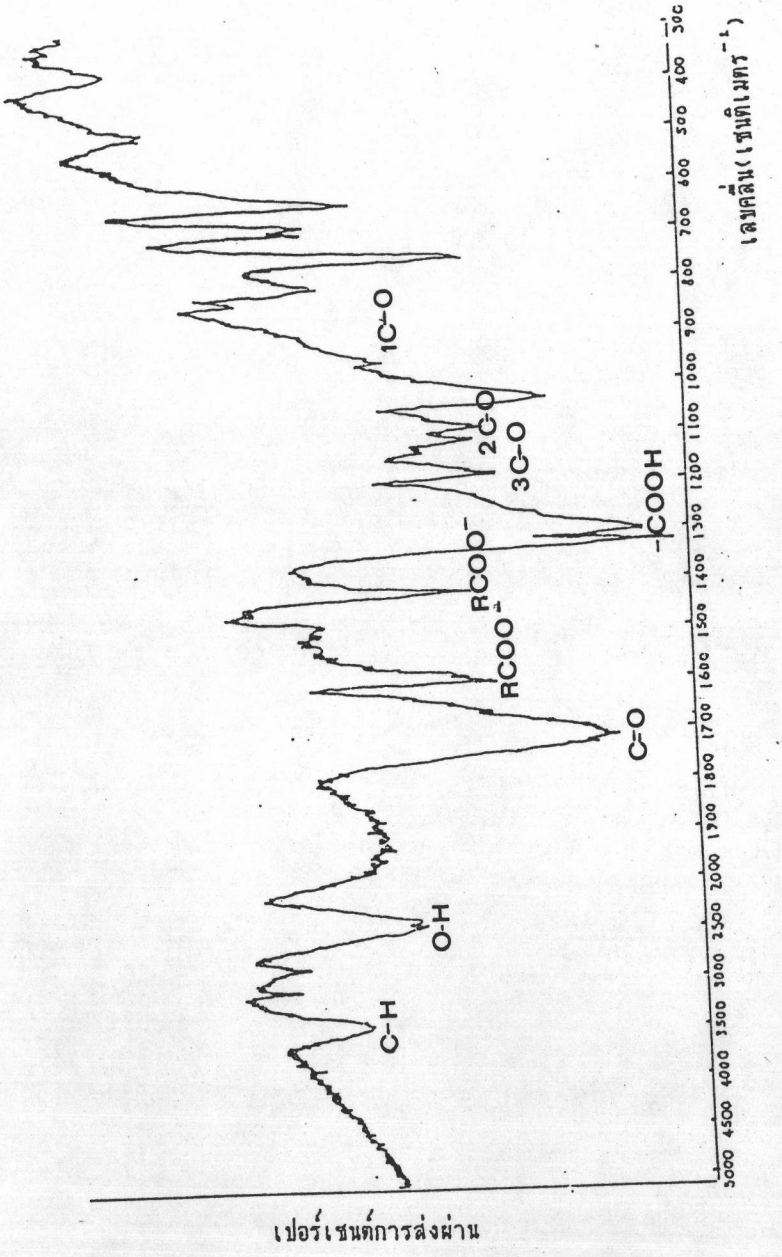
แบบต่อเนื่อง โดยใช้เครื่องสกัดแบบต่อเนื่องดังในรูปที่ 3.3 นาน 4 ชั่วโมงและสกัดซ้ำด้วยอีเทอร์แบบต่อเนื่องที่พีเอช 3 นาน 4 ชั่วโมง และลดปริมาตรจนตกตะกอนได้สารสีน้ำตาลเข้ม ทำการระเหิดที่ 180-240 องศาเซลเซียส และนำสารที่ได้จากการระเหิดละลายในแอลกอฮอล์ร้อนผสมกับถ่านกัมมันต์ 0.38 กรัม แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ตกผลึกในแอลกอฮอล์และน้ำได้สารสีขาวแกมเทา 1.5383 กรัม ดังรูปที่ 4.7 เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ลักษณะผลึกเป็นพู่เข็มซึ่งเป็นลักษณะผลึกของกรดนิโคตินิก แต่ต้องตรวจสอบว่าสารที่สังเคราะห์เป็นกรดนิโคตินิกหรือไม่ ด้วยอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี, นิวเคลียร์แมกนิติกเรโซแนนซ์ และอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างกรดนิโคตินิกมาตรฐาน กับกรดนิโคตินิกที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น



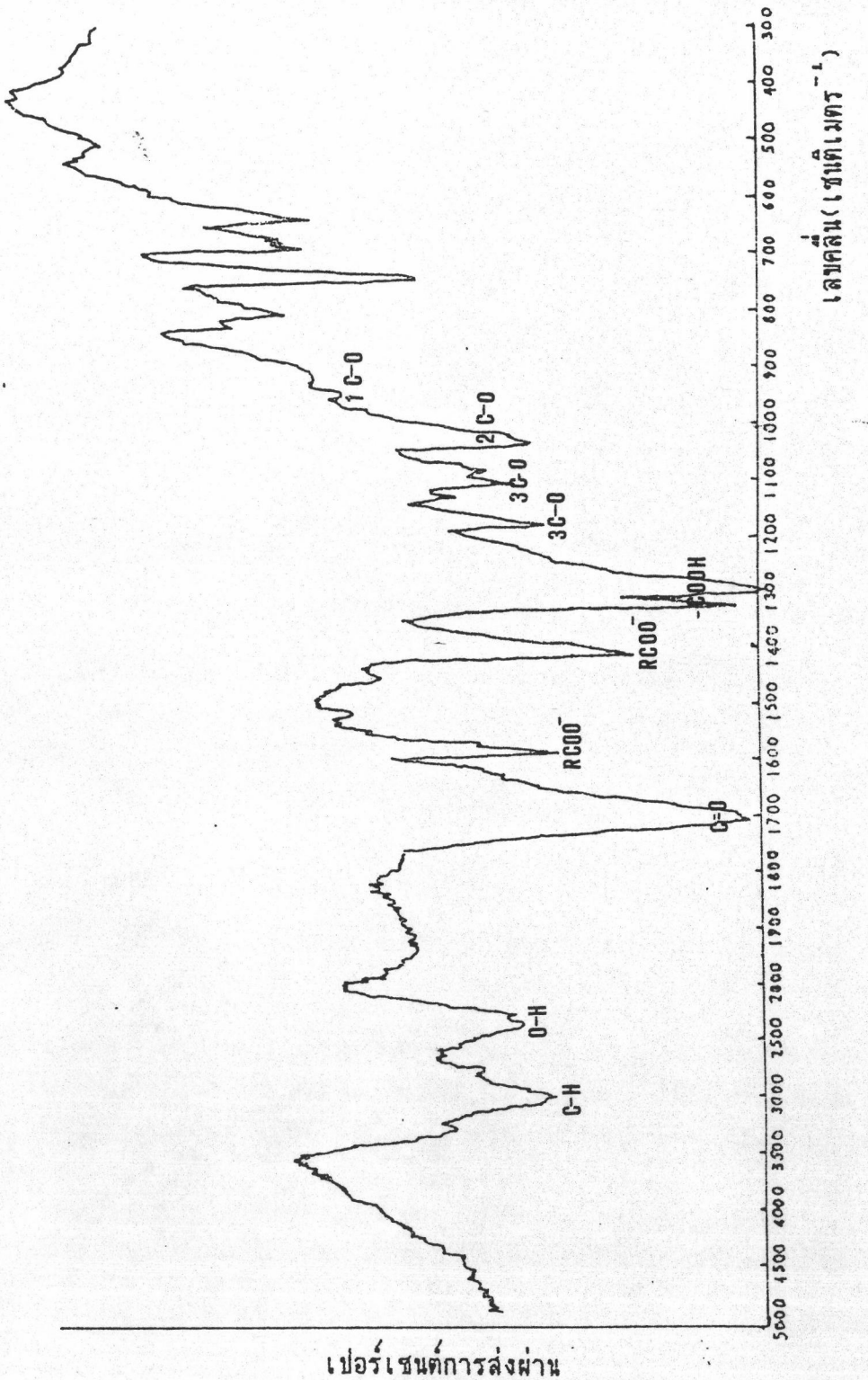
รูปที่ 4.7 ผลึกกรดนิโคตินิกที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากการทดลอง

4.3.1.1 การวิเคราะห์ตัวอย่างกรดนิโคตินิกโดยใช้อินฟราเรดสเปกโตร

สโกปี



รูปที่ 4.8 สเปกตรัมของอินฟราเรดสเปกโตรสโกปีของกรดนิโคตินิก



รูปที่ 4.9 สเปกตรัมอินฟราเรดสเปกโตรสโกปีของกรดนิโคตินิกที่สังเคราะห์ขึ้น

4.3.1.1.1 ผลการตรวจสอบเปรียบเทียบกราฟอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี ตามรูปที่ 4.8 และ 4.9

4.3.1.1.1.1 พันธะ C-H ในทฤษฎี (23) 2700 ถึง 3800 เซนติเมตร$^{-1}$ ส่วนกรดนิโคตินิคสังเคราะห์พันธะ C-H อยู่ที่ตำแหน่ง 3050 เซนติเมตร$^{-1}$ และกรดนิโคตินิคมาตรฐานอยู่ที่ตำแหน่ง 3400 เซนติเมตร$^{-1}$

4.3.1.1.1.2 พันธะ O-H ในกรดคาร์บอกซิลิกที่มีพันธะไฮโดรเจนยึดจับระหว่างโมเลกุล ทางทฤษฎีอยู่ ที่ตำแหน่ง 2600 เซนติเมตร$^{-1}$ กรดนิโคตินิกสังเคราะห์อยู่ที่ตำแหน่ง 2400 เซนติเมตร$^{-1}$ และ กรดนิโคตินิกมาตรฐานอยู่ที่ตำแหน่ง 2400 เซนติเมตร$^{-1}$ เช่นเดียวกัน

4.3.1.1.1.3 พันธะ C=O ในแอนไฮไดริดของกรดอยู่ที่ตำแหน่ง 1760 เซนติเมตร$^{-1}$ และกรดนิโคตินิกสังเคราะห์และกรดนิโคตินิกมาตรฐานอยู่ที่ตำแหน่ง 1710 เซนติเมตร$^{-1}$

4.3.1.1.1.4 พันธะ $RCOO^-$ ในเกลือคาร์บอกซิลิกจะอยู่ตำแหน่ง 1400 เซนติเมตร$^{-1}$ และ 1600 เซนติเมตร$^{-1}$ แต่กรดนิโคตินิกสังเคราะห์ และกรดนิโคตินิกมาตรฐานอยู่ที่ตำแหน่ง 1420 เซนติเมตร$^{-1}$ และ1600 เซนติเมตร$^{-1}$

4.3.1.1.1.5 พันธะ C-O-OH ในรูปกรดคาร์บอกซิลิกโดย O-H งออยู่ในระนาบและ C-O ยึดเป็นแบบไดเมอร์(dimer) จะได้ว่าทางทฤษฎี, กรดนิโคตินิกเคราะห์ และกรดนิโคตินิกมาตรฐาน อยู่ที่ตำแหน่ง 800-1200 เซนติเมตร$^{-1}$

4.3.1.1.1.6 พันธะ 3C-O ในแอลกอฮอล์, อีเทอร์ หรือเอสเทอร์ ณ ตำแหน่ง 1200 เซนติเมตร$^{-1}$ พันธะ 2C-O อยู่ ณ ตำแหน่ง 1100

เซนติเมตร$^{-1}$ และ 1C-O อยู่ ณ ตำแหน่ง 1050 เซนติเมตร$^{-1}$ ซึ่งทั้งทฤษฎี กรดนิโคตินิก สังเคราะห์และกรดนิโคตินิกมาตรฐานจะอยู่ในตำแหน่งเหล่านี้

4.3.1.2 การวิเคราะห์กรดนิโคตินิกด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

TOTAL 11

RESOL24414: -5 HZ

EXREF 0.0000PPM

OBS 414.7949 HZ

NGAIN 24

NO	FREQ(HZ)	PPM	INT%
1	817.07	9.127	1100
2	803.22	8.964	784
3	795.16	8.824	1122
4	793.45	8.855	1074
5	790.77	8.825	1020
6	731.66	8.165	692
7	724.60	8.086	723
8	710.01	8.013	476
9	431.64	4.017	168
10	253.90	2.833	437
11	0.00	0.000	6867

รูปที่ 4.10 สเปกตรัมนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของกรดนิโคตินิกมาตรฐาน

TOTAL 9

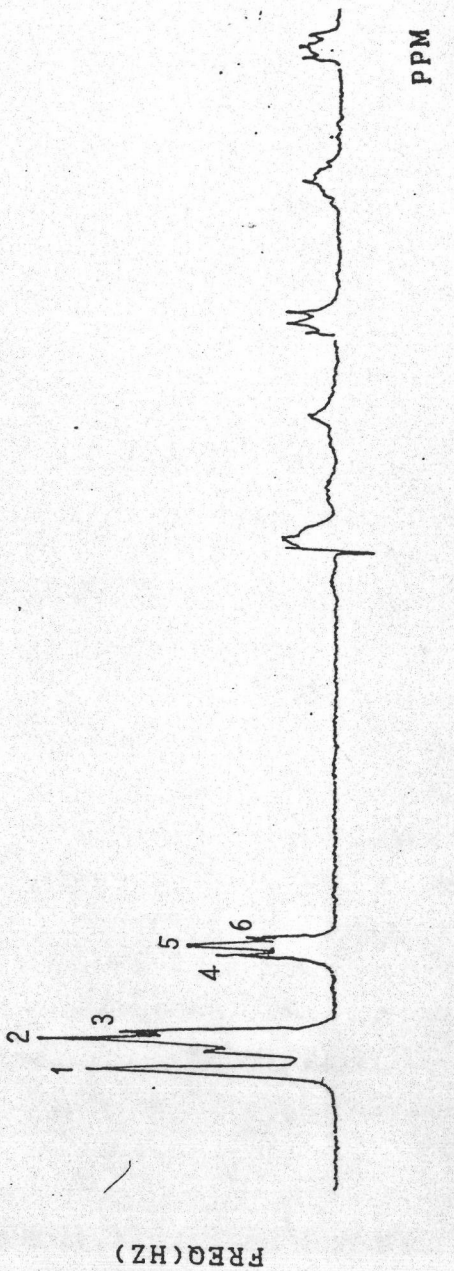
RESOL24414: -5 HZ

EXREF 0.0000PPM

OBS 146.0156 HZ

NGAIN 40

NO	FREQ(HZ)	PPM	INT%
1	823.73	9.193	2120
2	801.75	8.947	2597
3	796.38	8.837	1901
4	737.79	8.234	1051
5	731.44	8.163	1292
6	431.08	4.819	363
7	430.90	4.809	435
8	430.12	4.800	377



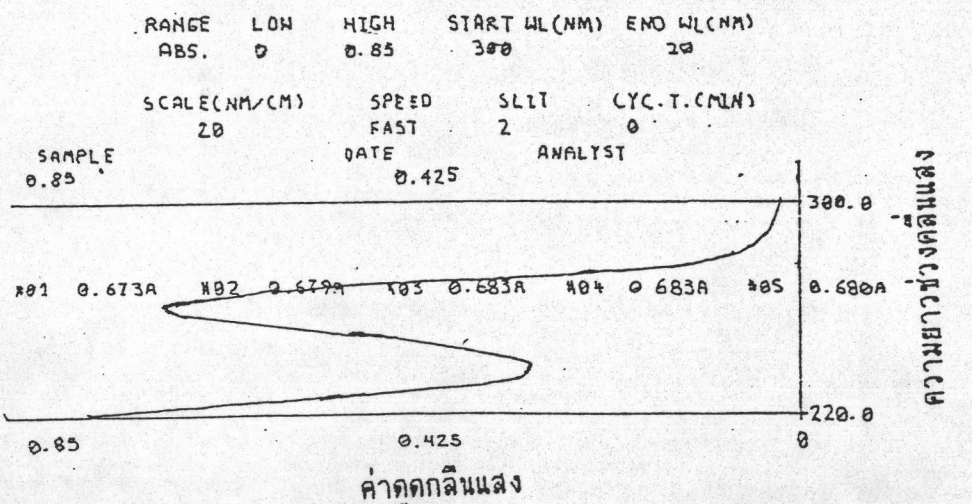
รูปที่ 4.11 สเปกตรัมนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของนิโคตินิกที่สังเคราะห์ขึ้น

4.3.1.2.1 ผลการตรวจสอบเปรียบเทียบสเปกตรัมนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ตามรูปที่ 4.10 และ4.11

4.3.1.2.1.1 ยอด(peak)แรกของกรดนิโคตินิกมาตรฐาน และกรดนิโคตินิกสังเคราะห์คือกลุ่มคาร์บอนซิลิก

4.3.1.2.1.2 ยอด(peak) ที่ 2 ถึง 5 ของกรดนิโคตินิกสังเคราะห์ กับยอด(peak) ที่ 2 ถึง 8 ของกรดนิโคนิกมาตรฐาน คือ วงอะโรเมติก(Aromatic ring)

4.3.1.3 การวิเคราะห์กรดนิโคตินิกโดยใช้อัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี



ค่าดูดกลืนแสง

รูปที่ 4.12 สเปกตรัมอัลตร้าไวโอเลตสเปกโตรสโกปีของกรดนิโคตินิกที่สังเคราะห์ขึ้น

4.3.1.3.1 ผลการตรวจสอบเปรียบเทียบสเปกตรัมอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปีตาม รูปที่ 4.2 และ 4.12

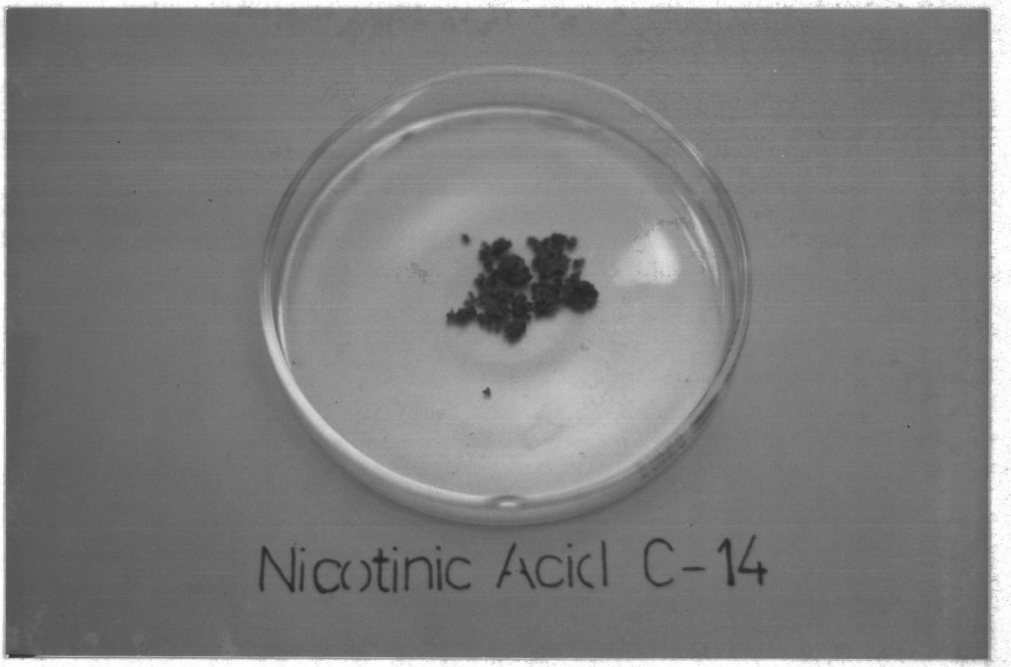
4.3.1.3.1.1 พบว่าความยาวช่วงคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปีของค่าดูดกลืนแสงของกรดนิโคตินิกสังเคราะห์ และกรดนิโคตินิก

มาตรฐานอยู่ที่ 261 นาโมเมตร

จากผลการวิเคราะห์ อินฟราเรดสเปกโตรสโกรปี, นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ และ อัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี สรุปได้ว่า กรดนิโคตินิกสังเคราะห์มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับกรดนิโคตินิกมาตรฐาน และเมื่อวัดค่าดูดกลืนแสงของสารกรดที่สังเคราะห์ขึ้น $10x10^{-3}$ มิลลิกรัม ที่อยู่ในรูปสารละลายด้วยเครื่องวัดอัลตราไวโอเลตสเปกโตรมิเตอร์ ณ ความยาวช่วงคลื่น 261 นาโมเมตร ของกรดนิโคตินิก $10x10^{-3}$ มิลลิกรัม ปรากฏมีเปอร์เซนต์กรดนิโคตินิกอยู่ 73.76 % (ภาคผนวก ฉ.5 หน้าที่ 149)

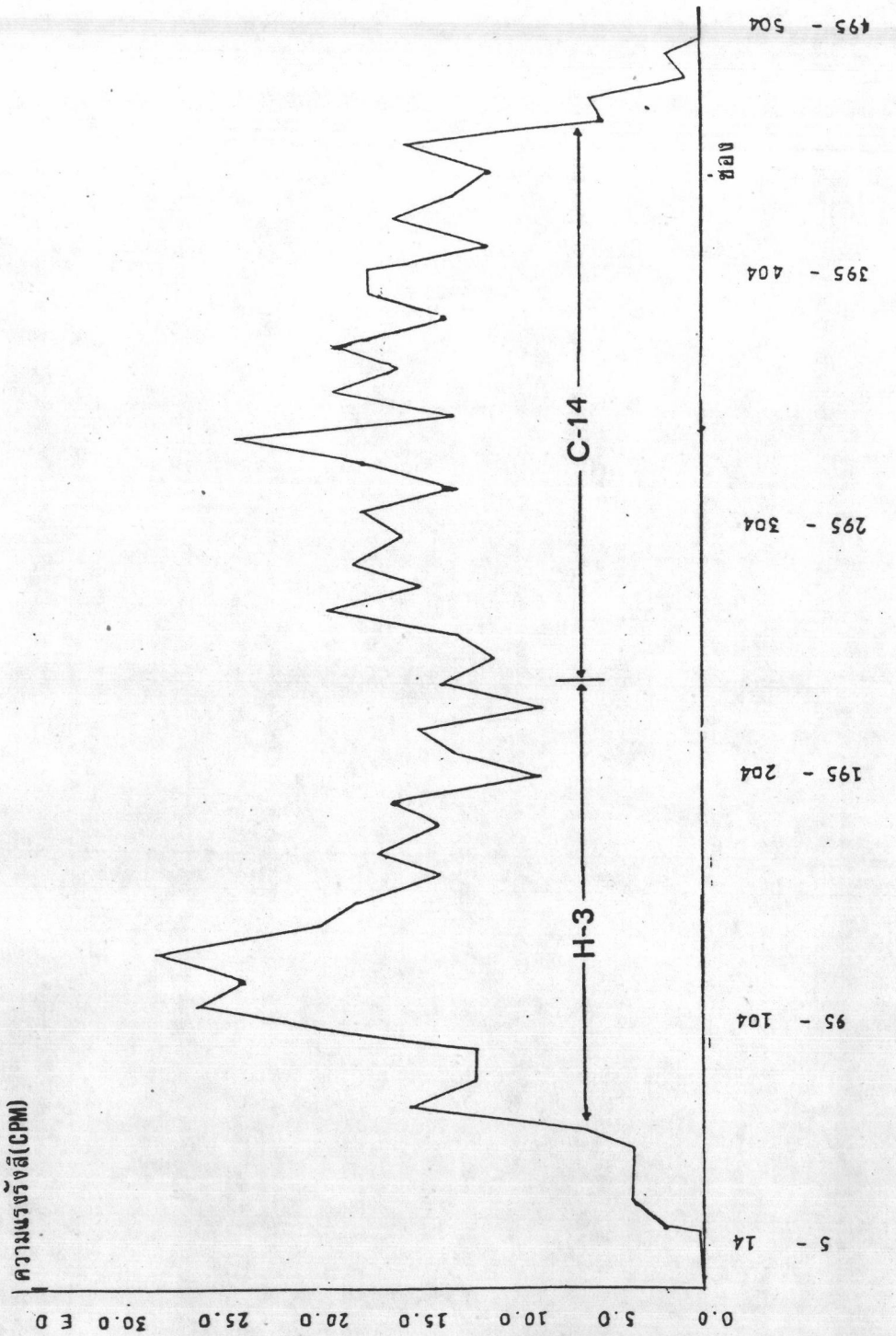
แต่การสังเคราะห์กรดนิโคตินิกกัมมันตรังสี C-14 นำนิโคตินมีด 5 กรัม ใส่ในหลอดแก้วควอทซ์ ใช้เปลวไฟปิดผนึกหลอดแก้ว แล้วนำไปอาบรังสีนิวตรอนช้าความเข้มข้น $0.7x10^{12}$ นิวตรอน/ตรางเซนติเมตร/วินาที นาน 6 สัปดาห์(288 ชั่วโมง) ณ ท่ออาบรังสี Rotary Specimen Rack (up position) ตำแหน่งที่ 12 อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เปิดผนึกหลอดได้นิโคตินามีดC-14 3.9161 กรัม ผสมกับถ่านกัมมันต์ 0.1 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ร้อน และกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 เติมเบนซามีด 5 กรัม ขจัดแอลกอฮอล์ออกด้วยเครื่องอังไอน้ำ(water bath)ที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส ได้สารประกอบอามีดกัมมันตรังสี 6.0707 กรัม แล้วแบ่งอามีดกัมมันตรังสีออกมาตัวอย่างละ 1 มิลลิกรัม 2 ตัวอย่าง นำแต่ละตัวอย่างมาละลายในเตทตราไฮโดรฟูราน 5 มิลลิลิตร และสารละลายคอกเทล(Cocktail) 15 มิลลิลิตร(ซึ่งประกอบไปด้วย PPO 20 กรัม กับ POPOP 0.5 กรัม ละลายในเบนซีน 1 ลิตร) ใส่ในขวดแก้วที่มีปริมาณโปแตสเซียมต่ำไปวัดในเครื่องลิควิดซินทิลเลชัน ซึ่งตั้งค่าไฟฟ้าแรงสูงเหมาะสม 1100 โวล์ต, ค่าขีดเริ่มเปลี่ยน(lower level discriminator) 240 โวล์ต, หน้าต่าง 1000 โวลต์ และอัตราการขยาย 1 วัดรังสีของสารประกอบอามีดกัมมันตรังสีได้ 11157.59 CPM/มิลลิกรัมสารประกอบอามีด(ดูภาคผนวก ฉ.5 หน้าที่ 150) นำอามีดกัมมันตรังสีไปไฮโดไลซ์ให้เป็นกรดโดยการรีฟลักซ์ด้วย 10% NaOH 150 ซีซี. นาน 2 ชั่วโมง

พีเอชหลังการรีฟลักซ์ 12 นำมาปรับพีเอชให้น้อยกว่า 1 ด้วยกรดHCl เข้มข้น และสกัดด้วย อีเทอร์ โดยแบ่งสารละลายกรดออกมาครั้งละ 100 ซีซี. ใช้อีเทอร์ 60 ซีซี. สกัดทำสามครั้งด้วยกรวยแยก แล้วนำสารละลายมาปรับพีเอช 3 และสกัดซ้ำด้วยอีเทอร์ หลังการสกัดปรากฏว่าได้ชั้นน้ำ และวัฏภาคที่ 3(interphase ซึ่งถ้าตั้งทิ้งไว้เป็นเวลานานจะแยกเป็นชั้นน้ำและอีเทอร์) ขจัดเอาน้ำออกด้วยเครื่องอังไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส ได้ตะกอนทำการตกผลึกในแอลกอฮอล์ และน้ำจะได้ผลึกกรด 4.2010 กรัม แล้วแบ่งกรดรังสีออกมาตัวอย่างละ 1 มิลลิกรัม 2 ตัวอย่าง นำแต่ละตัวอย่างมาละลายในเตทตราไฮโดรฟูราน 5 มิลลิลิตร และสารละลายคอกเทล 15 มิลลิลิตร (ซึ่งประกอบไปด้วย PPO 20 กรัม กับ POPOP 0.5 กรัม ละลายในเบนซีน 1 ลิตร)ใส่ในขวดแก้วที่มีปริมาณโปแตสเซียมต่ำไปวัดในเครื่องลิควิดซินทิลเลชันตามเงื่อนไขเดิมวัดรังสีของสารประกอบกรดได้ 4137.69 CPM/มิลลิกรัมสารประกอบกรด(ดูในภาคผนวก ฉ.5 หน้าที่ 151) นำสารประกอบกรดคาร์บอน 14 ทำปฏิกริยากับไดเอโซมีเทน 120 ซีซี. และขจัดอีเทอร์ออกโดยใช้เครื่องอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียสได้น้ำมันสีน้ำตาลนำไปรีฟลักซ์ด้วย NH_4OH เข้มข้น100 ซีซี. นาน 2 ชั่วโมง ลดปริมาตรหลังการรีฟลักซ์ได้สารละลายสีน้ำตาลแต่ไม่ให้ตกตะกอน แล้วนำไปรีฟลักซ์ด้วย 4N NaOH 100 ซีซี. นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำไปสกัดด้วยอีเทอร์นาน 4 ชั่วโมงโดยใช้เครื่องสกัดต่อเนื่องดังรูปที่ 3.3 แล้วจึงนำเอาชั้นน้ำมาทำการปรับพีเอช 3 ทำการสกัดโดยใช้เครื่องสกัดต่อเนื่องด้วยอีเทอร์นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำชั้นน้ำมาทำการระเหยออกจนหมดด้วยเครื่องอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จะได้ตะกอนสีน้ำตาล นำตะกอนมาทำการระเหิดที่อุณหภูมิ 180-240 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องระเหิดสารในรูปที่ 3.2 และนำสารที่ได้จากการระเหิดละลายในแอลกอฮอล์ร้อนผสมกับถ่านกัมมันต์ 0.19 กรัม แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ตกผลึกในแอลกอฮอล์ และน้ำได้สารสีน้ำตาลแก่ 0.89244 กรัม ดูรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 กรดนิโคตินิกกัมมันตรังสี C-14 ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น

ทำการแบ่งกรดกัมมันตรังสีออกมาตัวอย่างละ 2 มิลลิกรัม 2 ตัวอย่าง นำแต่ละตัวอย่างมาละลายในเตทต้าไฮโดรฟูราน 5 มิลลิลิตร และสารละลายคอกเทล(Cocktail)15 มิลลิลิตร(ซึ่งประกอบไปด้วย PPO 20 กรัม กับ POPOP 0.5 กรัม ละลายในเบนซีน 1 ลิตร) ใส่ในขวดแก้วที่มีปริมาณโปแตสเซียมต่ำนำไปวัดในเครื่องลิควิดซินทิลเลชันตามเงื่อนไขการวัดรังสีต้นกำเนิดรังสีเบตา C-14 วัดรังสีของสารประกอบกรดได้ 669.77 CPM/มิลลิกรัมสารประกอบกรด(ดูในภาคผนวก ฉ.5 หน้าที่ 152) และเมื่อวัดค่าดูดกลืนแสงของสารกรดที่สังเคราะห์ขึ้น $10x10^{-3}$ มิลลิกรัม ที่อยู่ในรูปสารละลายด้วยเครื่องวัดอัลตราไวโอเลตสเปกโตรมิเตอร์ ณ ความยาวช่วงคลื่น 261 นาโนเมตร ของกรดนิโคตินิกปรากฏมีเปอร์เซนต์กรดนิโคตินิกอยู่ 76.02 %(ดูในภาคผนวก ฉ.5 หน้าที่ 153)นอกจากนี้นำสารกรดนิโคตินิกกัมมันตรังสีที่ละลายในตัวเปล่ง นำไปวัดด้วยเครื่องลิควิดซินทิลเลชันที่ต่อกับเครื่องวิเคราะห์สัญญาณแบบหลายช่อง ปรากฏว่ากรดกัมมันตรังสีนี้ประกอบไปด้วยต้นกำเนิดรังสีเบตา คือ ทริเทียม และคาร์บอน 14 ดังรูปที่ 4.14

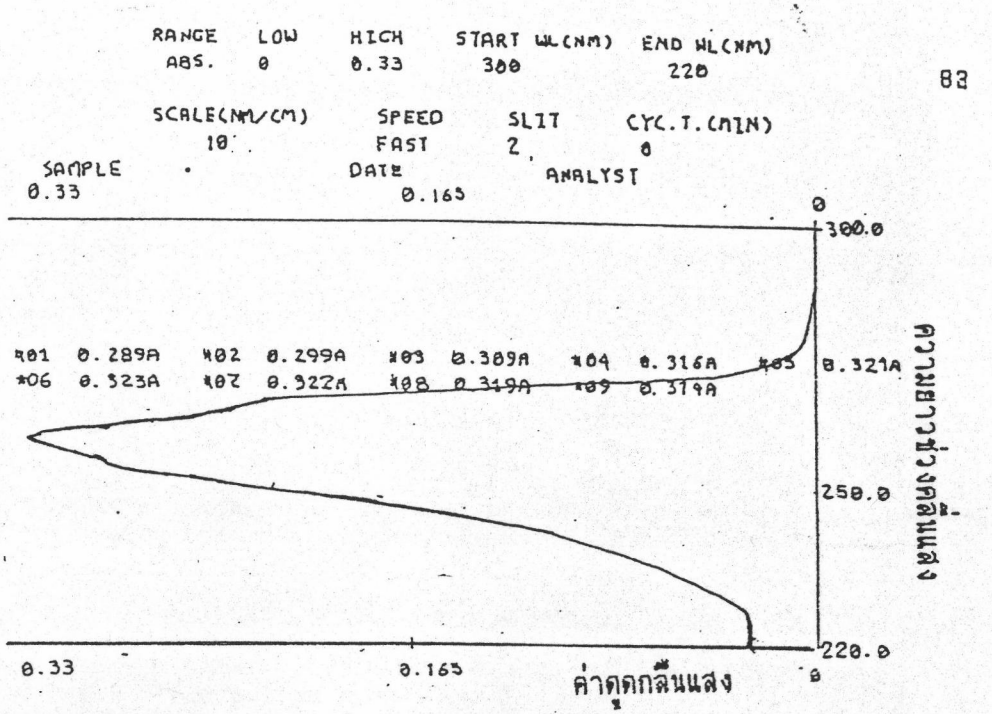


รูปที่ 4.14 สเปกตรัมของกรดนิโคตินิก C-14 เมื่อวัดรังสีด้วยเครื่องลิควิดซินทิลเลชันต่อกับเครื่องวิเคราะห์สัญญาณ

จากนั้นนำกรดรังสีทำการตรวจสอบด้วยหัววัดรังสีแกมม่า(HPGe) เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของต้นกำเนิดที่ให้รังสีแกมมาผลของการตรวจสอบไม่ปรากฏต้นกำเนิดรังสีแกมมา

ในการสังเคราะห์กรดนิโคตินิก H-3 จำเป็นต้องทำการทดลองเพื่อหากระบวนการสังเคราะห์ โดยนำกรดนิโคตินิกไม่ติดฉลากผสมกับ Li_2CO_3 ในอัตราส่วน 18.11 ต่อ 1 ส่วน บดให้ละเอียดผสมเป็นเนื้อเดียวกัน และนำมาระเหิดที่อุณหภูมิ 180-240 องศาเซลเซียส ตกผลึกด้วยแอลกอฮอล์ และน้ำ โดยที่ Li_2Co_3 ไม่ละลายในแอลกอฮอล์ ดังนั้นจึงได้กรดนิโคตินิกดังรูปที่ 4.15 ออกมาโดยตรวจสอบด้วยอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี ซึ่งดูได้จากสเปกตรัมอัลตราไวโอเลต ดังรูปที่ 4.16 เหมือนกับสเปกตรัมอัลตราไวโอเลตของกรดนิโคตินิกมาตรฐานในรูปที่ 4.2

รูปที่ 4.15 กรดนิโคตินิกที่ได้จากการสังเคราะห์

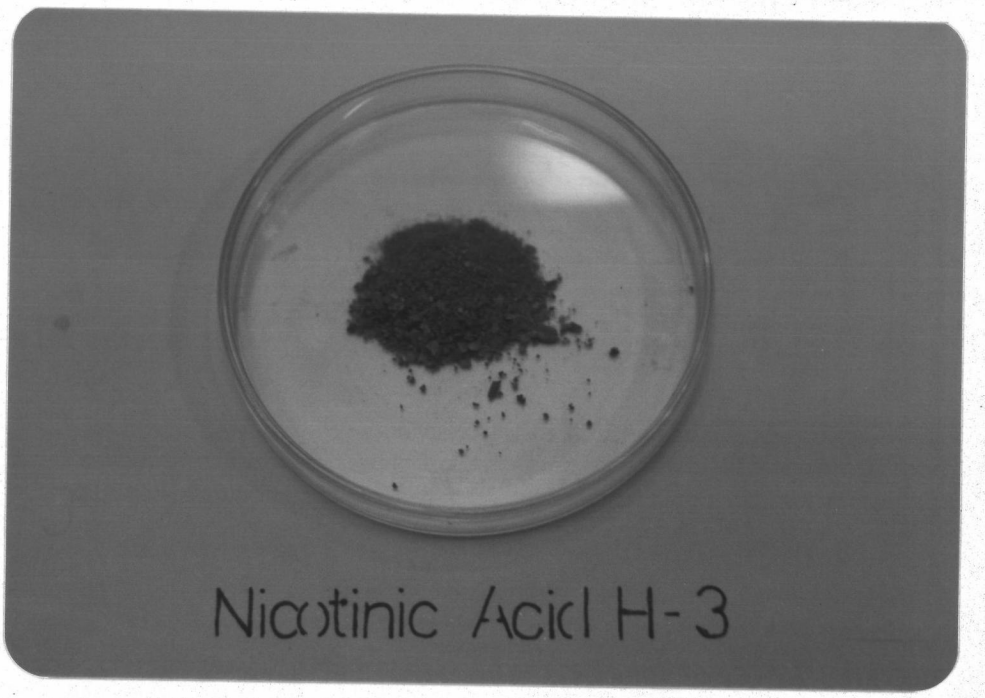


รูปที่ 4.16 สเปกตรัมการดูดกลืนอัลตราไวโอเลตของกรดนิโคตินิกที่สังเคราะห์ขึ้น

4.3.2 การสังเคราะห์กรดนิโคตินิก H-3

ในการสังเคราะห์นิโคตินิกH-3 จะนำกรดนิโคตินิก 20.1 กรัม ผสมกับ Li_2CO_3 1.11 กรัม ใส่ในโกร่งบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันแบ่งมา 3 ถึง 4 กรัม เทลงในหลอดแก้วควอทซ์ปิดผนึกด้วยไฟ และนำไปอาบรังสีนิวตรอนช้า 0.7×10^{12} นิวตรอน/ตรางเซนติเมตร/วินาที ณ ท่อ Rotary Specimen rack(up position) ตำแหน่งที่ 12 ที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง(ถ้าอาบรังสีนานถึง 24 หรือ 36 ชั่วโมง กรดนิโคตินิกจะสลายตัวกลายเป็นไอซึ่งจะเป็นอันตรายเมื่อเปิดผนึกหลอด)ทำการแช่หลอดแก้วหลังอาบรังสีในไนโตรเจนเหลวนาน 1 ถึง 2 ชั่วโมง เพื่อให้ไอกรดนิโคตินิกกลั่นตัวเป็นกรดนิโคตินิก และเปิดผนึกหลอดนำไปละลายน้ำและทำให้แห้งได้เป็นสารผสมลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล นำมาระเหิดที่

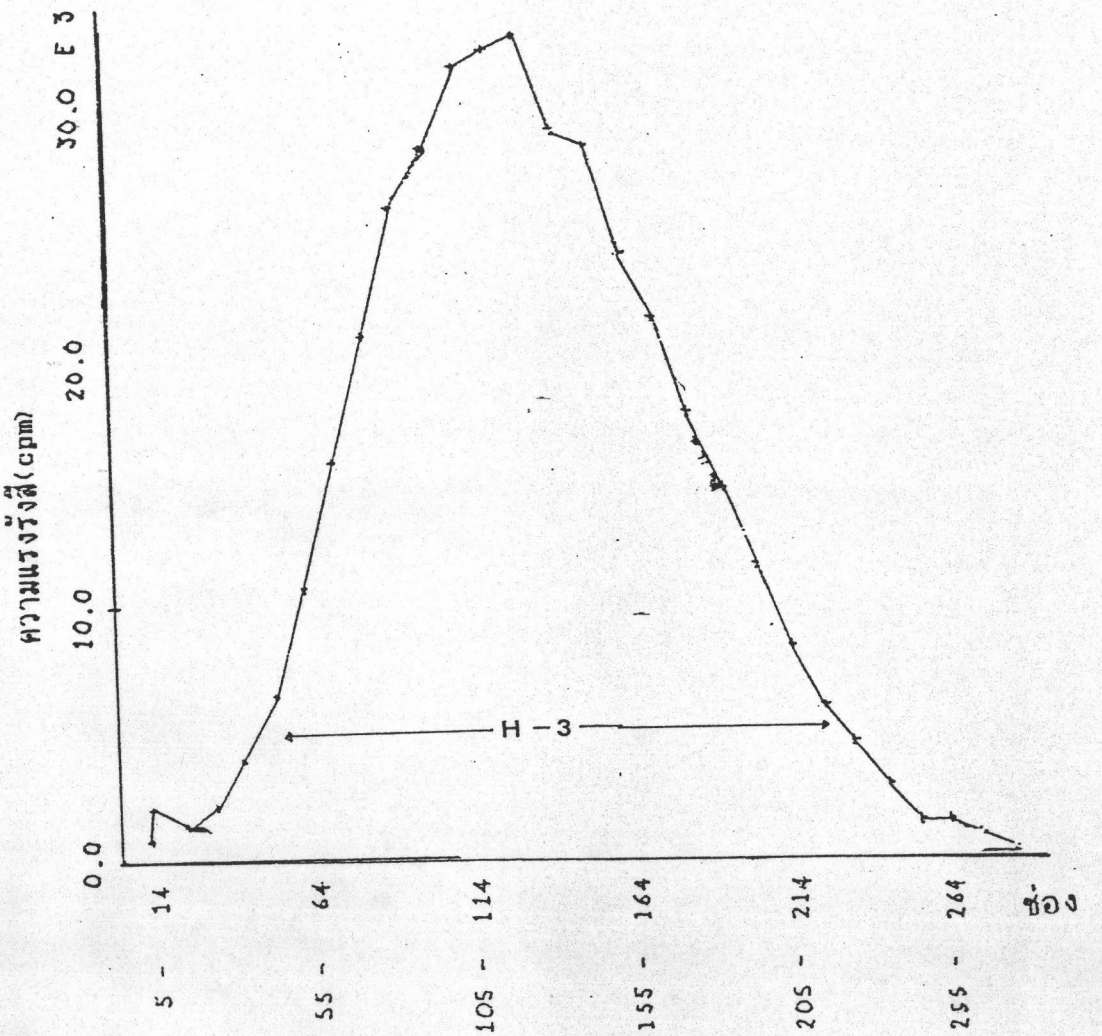
180 ถึง 240 องศาเซลเซียส และนำมาละลายในแอลกอออล์ และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ทำการตกผลึกด้วยแอลกฮอล์และน้ำได้สารรังสีสีน้ำตาล 0.714 กรัม ดังรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 กรดนิโคตินิกH-3 ที่สังเคราะห์ขึ้น

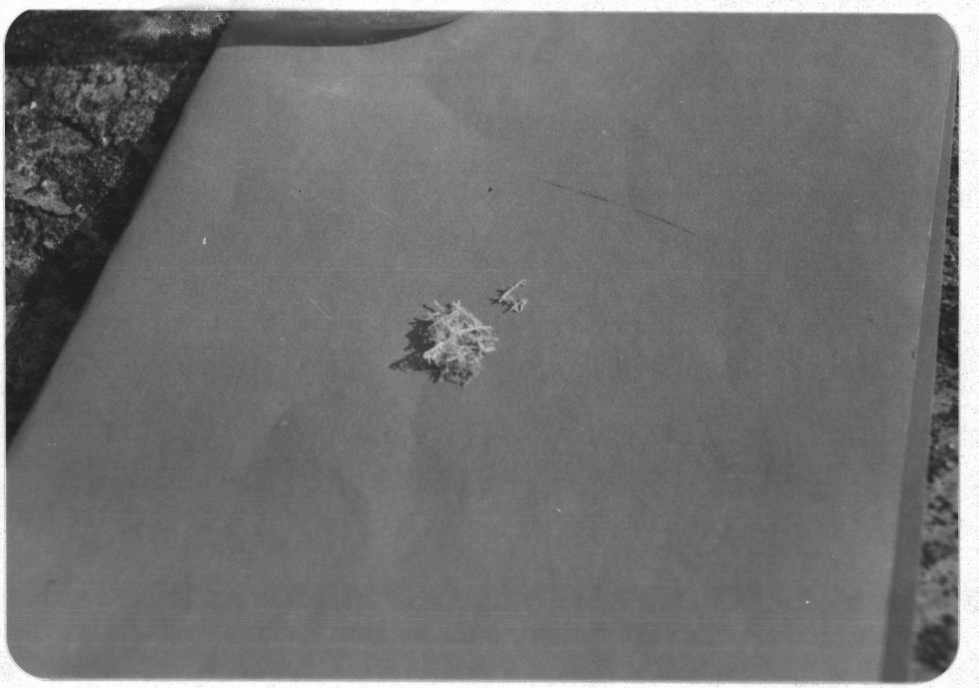
ทำการแบ่งกรดนิโคตินิกกัมมันตรังสีออกมาตัวอย่างละ 1 มิลลิกรัม 2 ตัวอย่าง นำแต่ละตัวอย่างมาละลายในเตทตราไฮโดรฟูราน 8 มิลลิลิตร และสารละลายคอกเทล 12 มิลลิลิตร (ซึ่งคอกเทลประกอบไปด้วยสารดังกล่าวมาแล้ว นำไปวัดในเครื่องลิควิดซินทิลเลชัน ตามเงื่อนไขในการวัดต้นกำเนิดรังสีเบตาH-3 วัดรังสีของสารประกอบกรดได้ 349641.2 CPM/มิลลิกรัมสารประกอบกรด(ดูในภาคผนวก ฉ.6 หน้าที่ 154) และเมื่อวัดค่าดูดกลืนแสงของสารกรดที่สังเคราะห์ขึ้น $10x10^{-3}$ มิลลิกรัม ที่อยู่ในรูปสารละลายด้วยเครื่องวัดอัลตราไวโอเลตสเปกโตรมิเตอร์ ณ ความยาวช่วงคลื่น 261 นาโนเมตร ของกรดนิโคตินิก ปรากฏมีเปอร์เซนต์กรดนิโคตินิกอยู่ 73.96 %(ดูในภาคผนวก ฉ.6 หน้าที่ 155) นอกจากนี้นำสารกรดกัมมันตรังสีที่

ละลายในตัวเปล่งแสง นำไปวัดด้วยเครื่องลิควิดซินทิลเลชันที่ต่อกับเครื่องวิเคราะห์สัญญาณแบบหลายช่องปรากฏว่ากรดกัมมันตรังสีนี้ประกอบไปด้วยต้นกำเนิดรังสีเบตาคือ ทริเทียม เท่านั้น ดังสเปกตรัมรังสีในรูปที่ 4.18



รูปที่ 4.18 สเปกตรัมของกรดนิโคตินิกทริเทียมที่สังเคราะห์ขึ้นเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องลิควิดซินทิลเลชันที่ต่อกับเครื่องวิเคราะห์สัญญาณแบบหลายช่อง

การเพิ่มความบริสุทธิ์ของกรดนิโคตินิกกัมมันตรังสี ทำโดยนำกรดนิโคตินิกทริเทียมมาละลายในน้ำ และปรับพีเอชให้น้อยกว่า 1 ด้วยกรดHClเข้มข้น แล้วสกัดด้วยอีเทอร์โดยอาศัยกรวยแยก นำสารละลายน้ำมาปรับพีเอช 3 ด้วย NH_4OHเข้มข้น และทำการสกัดด้วยอีเทอร์ซ้ำ จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่องอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 80-95 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้ทำการตกผลึกด้วยน้ำ และแอลกอฮอล์จะได้ผลึกสีขาว นำผลึกกรดสีขาวมาระเหิดด้วยเครื่องระเหิดที่อุณหภูมิ 180-240 องศาเซลเซียส จะได้สารหลังการระเหิดสีขาวปนเหลืองและนำมาละลายในแอลกอฮอล์ร้อนที่ผสม กับถ่านกัมมันต์ 0.19 กรัม แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 และตกผลึกด้วยแอลกอฮอล์และน้ำ จะได้สารกัมมันตรังสีสีขาวดังรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.19 กรดนิโคตินิกกัมมันตรังสีหลังทำให้บริสุทธิ์

นำกรดทริเทียมที่สังเคราะห์ขึ้น ปริมาณ $10x10^{-3}$ มิลลิกรัม ที่อยู่ในรูปสารละลายไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดอัลตร้าไวโอเลตสเปกโทรมิเตอร์ที่ ความยาวคลื่น 261 นาโนเมตร ปรากฏมีเปอร์เซนต์กรดนิโคตินิกอยู่ 97.84%(ดูในภาคผนวก ฉ.6 หน้าที่ 155)

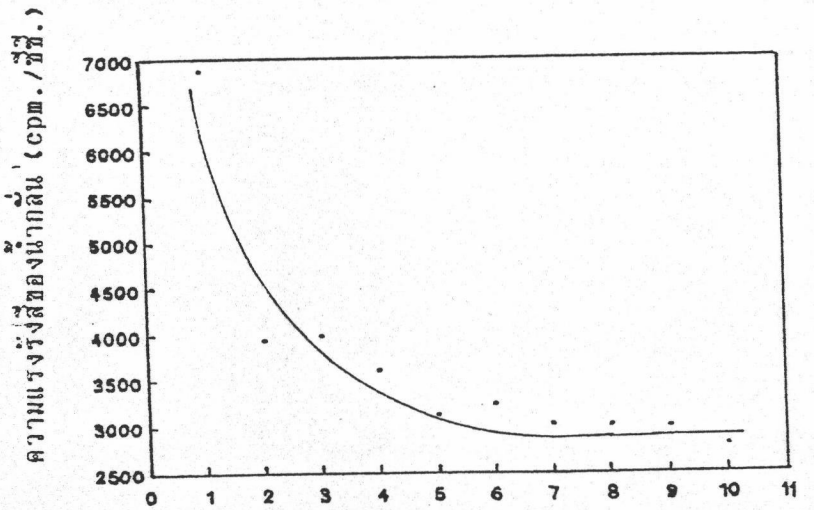
การขจัดทริเทียมที่ตำแหน่งเคลื่อนย้ายของกรดนิโคตินิก(labile) คือ หมู่คาร์บอกซิล จึงต้องขจัดออก โดยทำการล้างด้วยน้ำ และนำน้ำที่กลั่นจากเครื่องกลั่น ดังรูปที่ 3.7 ออกมาวัดรังสีด้วยเครื่องวัดลิควิดซินทิลเลชัน นำน้ำที่กลั่นออกมา 20 ไมโครลิตร ละลายในเตทตราไฮโดรฟูราน 5 มิลลิลิตร และสารละลายคอกเทล(Cocktail) 15 มิลลิลิตร และทำการวัดรังสีตามเงื่อนไขที่ทำการวัดต้นกำเนิดรังสีเบตาH-3 วัดรังสีของสารละลายในแต่ละลำดับส่วน ถ้าส่วนใดไม่สามารถวัดกัมมันตภาพรังสีได้แสดงว่ากรดนิโคตินิกรังสีในขวดกลั่นปราศจากทริเทียมที่เคลื่อนย้ายออกไปได้ ซึ่งตรวจสอบได้จากตารางที่ 4.1 และกราฟความสัมพันธ์การกลั่นลำดับส่วนแต่ละครั้งกับปริมาณกัมมันตภาพรังสีที่วัดได้(ดูในภาคผนวก ฉ.6 หน้าที่ 156)ในรูปที่ 4.20

ตารางที่ 4.1 ปริมาณทริเทรียมที่ตำแหน่งเคลื่อนย้ายในสารละลายแต่ละลำดับส่วนที่เก็บได้ในขวดรองรับ

ส่วนที่	ปริมาณสารละลาย (มิลลิลิตร)	ปริมาณกัมมันตภาพรังสี (CPM/20 ไมโครลิตร)
1	2	6862.5
2	2	3927.5
3	2	3979.5
4	2	3602.5
5	2	3119.5
6	2	3231.5
7	2	3004.5
8	2	2999.0
9	2	2989.0
10	2	2790.5

กำหนดให้ ค่าพื้นที่ขจัดหลัง(background) 2866.5 cpm

หมายเหตุ ส่วนที่เก็บ คือ ส่วนที่เก็บจากการกลั่นปริมาตรครั้งละ 2 มิลลิลิตร



รูปที่ 4.20 ปริมาณรังสีจากน้ำที่ใช้ในการล้างกรดนิโคตินิกกัมมันตรังสีแต่ละครั้ง

จากกราฟที่ 4.20 ในการกลั่นล่าดับส่วนครั้งที่ 10 จะได้กรดนิโคตินิกกัมมันตรังสีที่ปราศจากทริเทียมต่ำแหน่งที่เคลื่อนย้ายออกไปได้ แบ่งกรดนิโคตินิกกัมมันตรังสีออกมาตัวอย่างละ 1 มิลลิกรัม 2 ตัวอย่าง นำแต่ละตัวอย่างมาละลายในเตทตราไฮโดรฟูราน 5 มิลลิลิตร และสารละลายคอกเทล 15 มิลลิลิตร นำไปวัดในเครื่องลิควิดซินทิลเลชันตามเงื่อนไขในการวัดต้นกำเนิดรังสีเบตาH-3 วัดรังสีของสารประกอบกรดได้ 8758.67 CPM/มิลลิกรัมของกรดนิโคตินิกกัมมันตรังสี(ดูในภาคผนวก ฉ.6 หน้าที่ 158)

เมื่อนำกรดนิโคตินิกกัมมันตรังสีนี้มาทำการตรวจสอบด้วยหัววัดรังสีแกมมาแบบHPGe เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของต้นกำเนิดที่ให้รังสีแกมมาผลของการตรวจสอบไม่ปรากฏต้นกำเนิดรังสีแกมมา

จากการทดลองในการสังเคราะห์กรดนิโคตินิกกัมมันตรังสี พบว่าการสังเคราะห์กรดนิโคตินิกทริเทียมมีวิธีการสังเคราะห์ที่ง่ายกว่า มีความบริสุทธิ์และความแรงรังสีสูงกว่า กรด

นิโคตินิกC-14 วิธีเตรียมกรดนิโคตินิกทริเทียมจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการสังเคราะห์นิโคติน กัมมันตรังสี

4.4 ผลการทดลองเรื่องการหาประสิทธิภาพของเครื่องวัดลิควิดซินทิลเลชั่นใช้ในการทดลองสำหรับทริเทียม

ในการทดลองเมื่อนำสารประกอบ หรือสารละลายที่ติดฉลากทริเทียม ไปละลายในเตทตราไฮโดฟูราน 8 มิลลิลิตร และเติมสารละลายดอกเทล 12 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดรังสีด้วยเครื่องวัดลิควิดซินทิลเลชันตามเงื่อนไขในการวัดต้นกำเนิดรังสีเบตาH-3 ได้ประสิทธิภาพของเครื่องวัดลิควิดซินทิลเลชันเมื่อทำการนับวัดตามเงื่อนไขนี้เป็น 13.13%(ดูในภาคผนวก ฉ.7 หน้าที่ 158-161)

แต่ถ้านำสารประกอบ หรือสารละลายที่ติดฉลากทริเทียมไปละลายในเตทตราไฮโดฟูราน 5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายดอกเทล 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดรังสีด้วยเครื่องวัดลิควิดซินทิลเลชันตามเงื่อนไขในการวัดต้นกำเนิดรังสีเบตาH-3 ได้ประสิทธิภาพของเครื่องวัดลิควิดซินทิลเลชันตามเงื่อนไขที่กำหนด 16.40%(ดูในภาคผนวก ฉ.7 หน้าที่ 158-161)

4.5 ผลการทดลองเรื่องการสังเคราะห์นิโคติน และนิโคตินกัมมันตรังสี

ในการสังเคราะห์นิโคตินและนิโคตินกัมมันตรังสีจะอาศัยเนื้อเยื่อคัลลัสของต้นใบยา Nicotiana tabacum พันธุ์เบอร์เร่ย์(Burrey) ชนิด KY-14 หรือชื่อทางภาษาอังกฤษว่า เคนทักกี 14 และภาษาไทยว่าเขียวใหญ่ 14(ตามภาคผนวก ข) โดยคัลลัสนี้ได้จากการนำเมล็ดต้นใบยาสูบนำมาแช่ในน้ำกลั่น 1 คืนเลือกเอาเมล็ดที่จมน้ำซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีในการงอก และทำการล้างด้วยผงซักฟอกและน้ำ แล้วทำการให้ไร้เชื้อโดยวิธีแช่เมล็ดใบยาสูบ 100 มิลลิกรัมลงใน 35% น้ำหนักต่อปริมาตร H_2O_2 ที่ผสมกับ 1% Tween 80 นาน 2 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น นำไปเพาะบนกระดาษกรองเปียกน้ำ 4 ซีซี. 2 ชั้นไว้ในที่มืดเพื่อให้งอกนาน 7 วัน ณ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 30-40 % จะได้ต้นกล้าดังแสดงในรูปที่ 4.21

รูปที่ 4.21 ต้นกล้าของต้นไบยาสูบที่เพาะจากเมล็ดในการทดลอง

นำต้นกล้าไปเพาะช่า 7 วันให้แสงสว่าง 4.125-4.4 กิโลลักซ์ 16 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 30-40 % เพื่อให้ต้นกล้าสังเคราะห์แสง หลังจากนั้นย้ายต้นกล้ามาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Murashige และ Skoog หรือ M&S (1962) ที่ประกอบด้วย 10 IAA และ 0.1ไคนิติน(ดังในภาคผนวก ค และ ง)เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใหม่สูตรM&S 10 IAA และ 0.1 K ทุก ๆ 3 สัปดาห์ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 2 เดือน ได้การเจริญเติบโตของต้นกล้าดังแสดงในรูปที่ 4.22

สัปดาห์ที่ 1

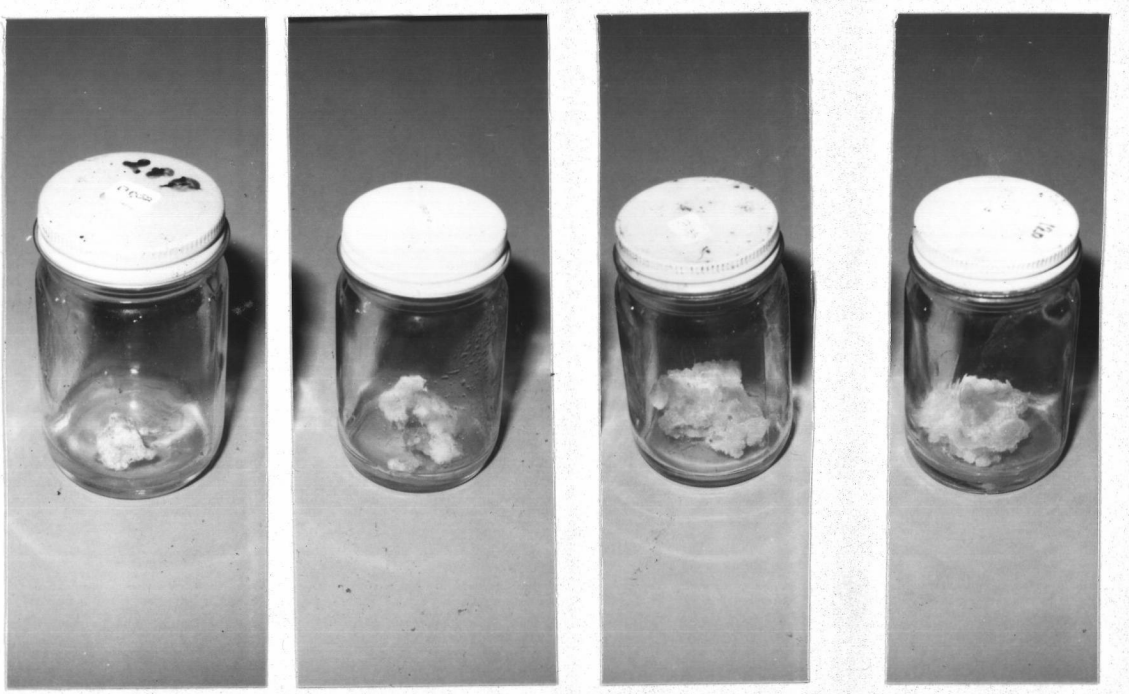
สัปดาห์ที่ 3

สัปดาห์ที่ 5

สัปดาห์ที่ 8

รูปที่ 4.22 การเจริญเติบโตของต้นใบยาสูบในระยะเวลา 2 เดือน

หลังจาก 2 เดือน จะได้ต้นไบยาสูบสูงขนาด 7-10 เซนติเมตร แล้วจึงนำมาทำให้กลายเป็นคัลลัส โดยทำการตัดต่ำกว่ายอด 3 เซนติเมตร และสูงกว่ารากออก 2 เซนติเมตร แบ่งลำต้นขนาด 1 เซนติเมตร เพาะให้กลายเป็นคัลลัส โดยวิธีการเพาะเลี้ยงบน M&S 11.5 μM NAA และ 1 μM ไคนิติน ในห้องมืดที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 30 ถึง 40% นาน 4 สัปดาห์ เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคัลลัสทุก ๆ 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการคัดเลือกคัลลัสที่มีลักษณะร่วนสีเขียวแกมขาว แล้วทำการขยายพันธุ์เพิ่มโดยอาศัยอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ M&S 11.5 μM NAA และ 1 μM ไคนิติน นาน 4 สัปดาห์ในรูปที่ 4.23

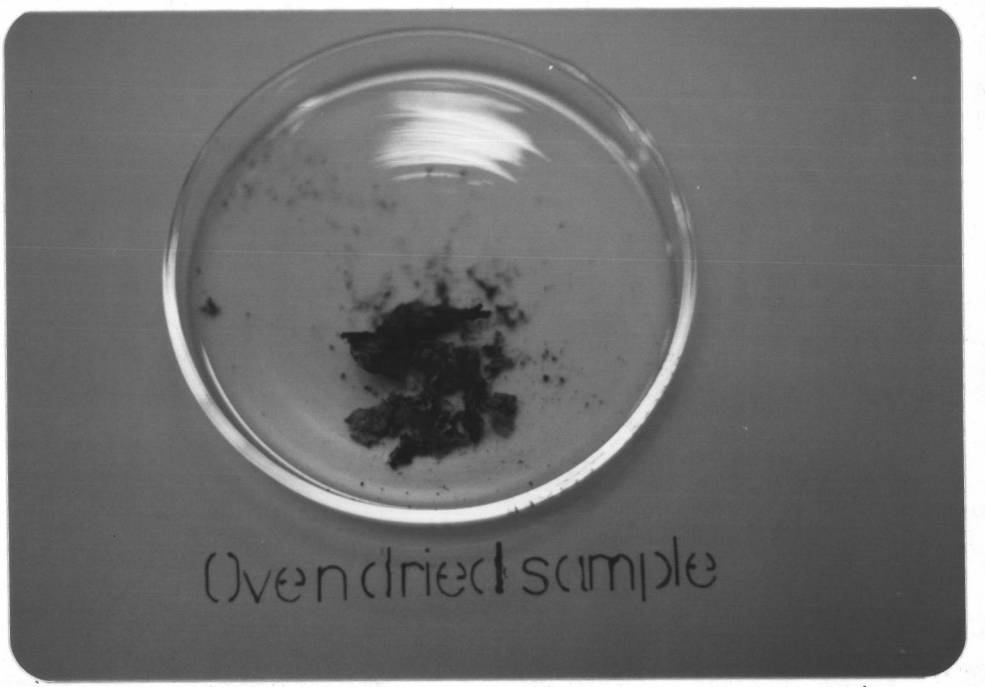


สัปดาห์ที่ 1 สัปดาห์ที่ 2 สัปดาห์ที่ 3 สัปดาห์ที่ 4

รูปที่ 4.23 การเจริญเติบโตของคัลลัสในระยะเวลา 4 สัปดาห์

ตามการวิจัยของ Pinol และคณะ (18) ทำการตัดเนื้อเยื่อคัลลัสขนาด 30±1 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้ง ที่ได้จากการอบคัลลัสที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ดังนั้นจึง

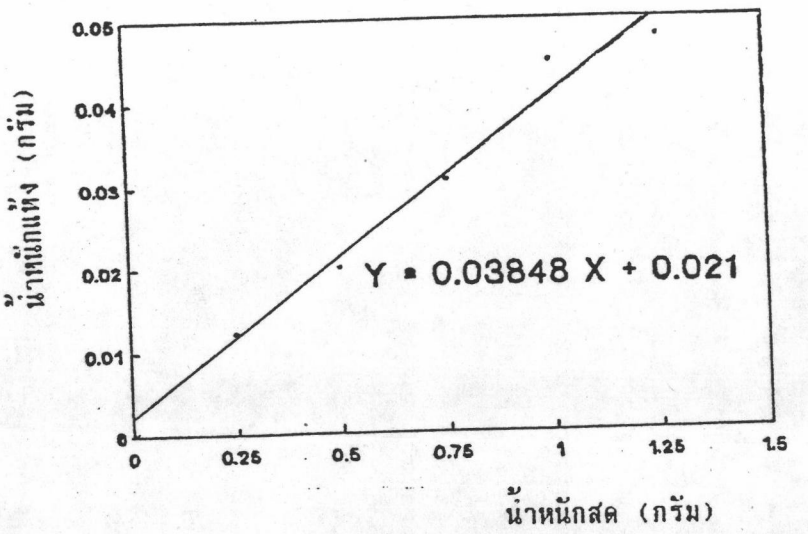
จำเป็นต้องทราบความสัมพันธ์ระหว่างคัลลัสที่ชั่งในรูปน้ำหนักสดกับคัลลัสที่ชั่งในรูปน้ำหนักแห้ง ความสัมพันธ์นี้ทำโดยการตัดคัลลัสไปชั่งในรูปน้ำหนักสดขนาด 0.25, 0.5, 0.75, 1.00 และ 1.25กรัม นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงดังในรูป 4.24 แล้วจึงทำการวัดน้ำหนักแห้งของคัลลัส



รูปที่ 4.24 คัลลัสที่ถูกอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

จะได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงตามสมการที่ 5 และเขียนเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างคัลลัสที่ชั่งในรูปน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งได้ดังรูปที่ 4.25(ภาคผนวก ฉ.8 หน้าที่ 162)

คัลลัสที่ชั่งในรูปน้ำหนักแห้ง(กรัม) = (0.03848xคัลลัสที่ชั่งในรูปน้ำหนักสด(กรัม))+0.0021 (5)



รูปที่ 4.25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างคัลลัสที่ชั่งในรูปน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง

ซึ่งเมื่อคำนวณโดยใช้สมการที่ 5 ใช้คัลลัสแห้ง 29-31 มิลลิกรัม คิดเป็นน้ำหนักสด 0.6990-0.7510 กรัม เพื่อจะได้ทำการเพาะเลี้ยงคัลลัสบนอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ M&S 1 μM NAA และ 1 μM ไคนิติน(จากรายงานของ Pinol และคณะ (13) แสดงว่าถ้าใช้ปริมาณไคนิติน 1 ไมโครโมล จะสามารถสังเคราะห์นิโคตินได้สูงสุด)นาน 7-8 สัปดาห์ แต่ในการทดลองแบบของ Robins และคณะ (19) ได้ทำการทดลองสังเคราะห์นิโคตินจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 แบบ คือ แบบแบช(batch)หรือแบบที่ไม่มีการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และแบบการไหลอย่างต่อเนื่อง(continuous flow) หรือแบบที่มีการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้ในการทดลองนี้จำเป็นต้องศึกษาถึงผลกระทบในแง่การเจริญเติบโตและการสังเคราะห์ โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 แบบ(ดูได้จากภาคผนวก ฉ.9 หน้าที่162-167)

4.5.1 แบบเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงทุก ๆ 2 สัปดาห์

4.5.2 ไม่เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยง

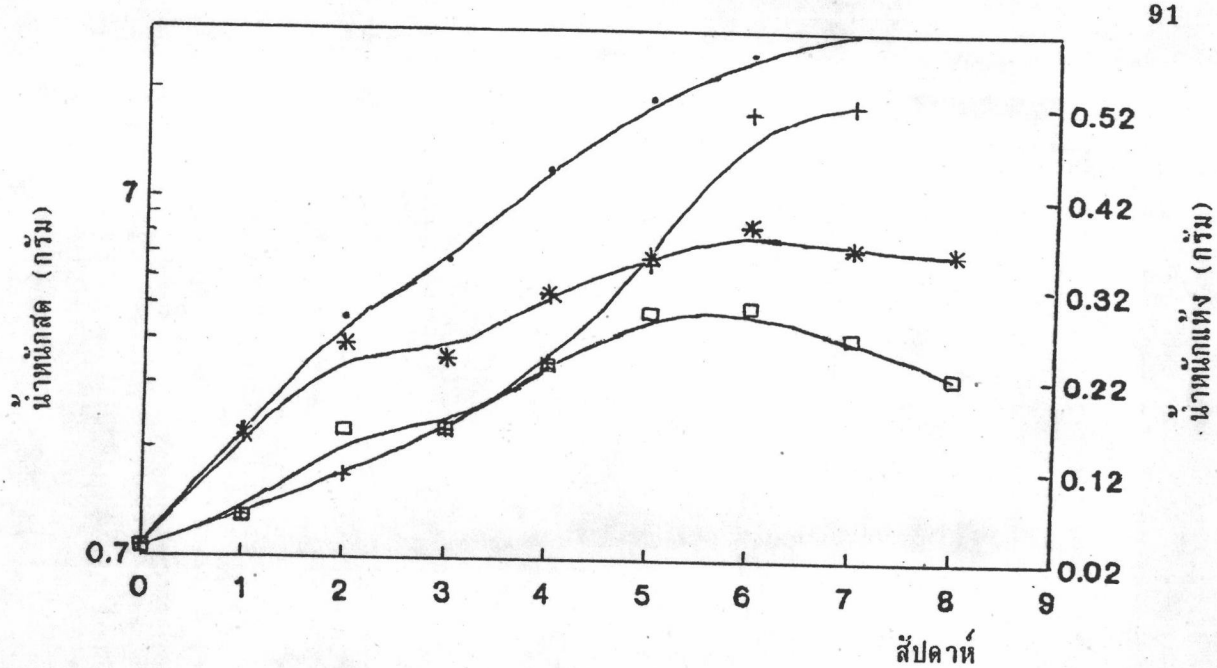
ทำการวัดการเจริญเติบโตของคัลลัสทุกๆสัปดาห์ จากน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของคัลลัสซึ่งแสดงผลในตารางที่ 4.2 และดังกราฟรูปที่ 4.26 และในรูปที่ 4.27 แสดงการเจริญ

เติบโตของคัลลัส

ตารางที่ 4.2 การเจริญเติบโตของคัลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ M&S 1 μM NAA และ 1 μM ไคนิติน

สัปดาห์	การเจริญเติบโตของคัลลัส			
	แบบเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยง		แบบไม่เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยง	
	น้ำหนักสดคัลลัส	น้ำหนักแห้งคัลลัส	น้ำหนักสดคัลลัส	น้ำหนักแห้งคัลลัส
0	0.7567+0.0125	0.0288+0.0009	0.74+0.0164	0.0282+0.0020
1	1.5593+0.0692	0.0648+0.0066	1.5029+0.0365	0.0626+0.0082
2	3.2357+0.2562	0.1098+0.0067	2.7386+0.1794	0.1591+0.0152
3	4.7236+0.1034	0.1598+0.0142	2.5188+0.1544	0.1598+0.0031
4	8.3429+0.8711	0.2355+0.0124	3.8381+0.4700	0.2327+0.0107
5	13.2426+1.0582	0.3455+0.0220	4.8258+0.5968	0.2907+0.0252
6	17.6364+1.6455	0.5101+0.0209	5.9113+0.0723	0.2974+0.0252
7	20.1957+0.7433	0.5190+0.0088	5.1326+0.6662	0.2636+0.0303
8	-	-	5.0095+0.5387	0.2206+0.0263

หมายเหตุ - คือ เนื้อเยื่อเจริญที่ทำหน้าที่สังเคราะห์นิโคตินกลายไปเป็นอวัยวะอื่น ได้แก่ ราก ทำให้ลดการสังเคราะห์นิโคติน



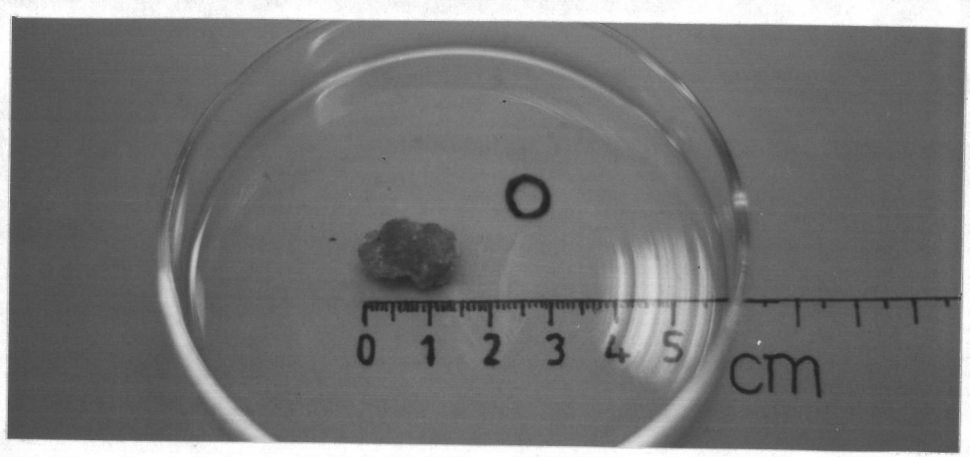
น้ำหนักสดของคัลลัสที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

น้ำหนักสดของคัลลัสที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบไม่เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

น้ำหนักแห้งของคัลลัสที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

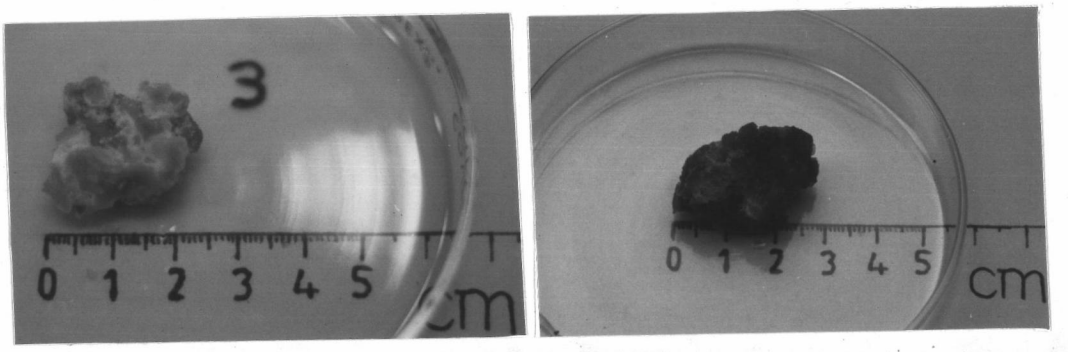
น้ำหนักแห้งของคัลลัสที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบไม่เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

รูปที่ 4.26 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของคัลลัสบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ M&S 1μM NAA และ 1μM ไคนิติน

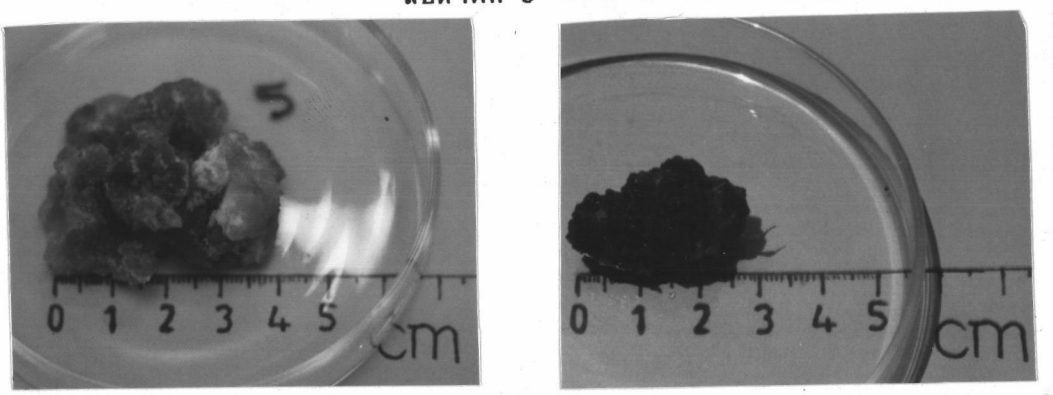


สัปดาห์ที่ 1

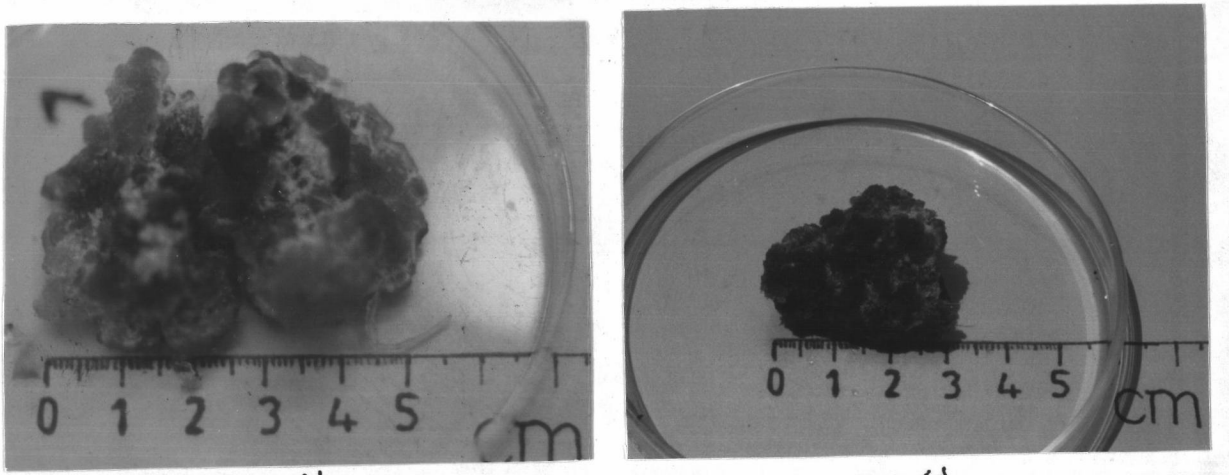
แบบเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แบบไม่เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



สัปดาห์ที่ 3



สัปดาห์ที่ 5



สัปดาห์ที่ 7 สัปดาห์ที่ 8

รูปที่ 4.27 การเจริญเติบโตของคัลลัสในระยะเวลา 8 สัปดาห์

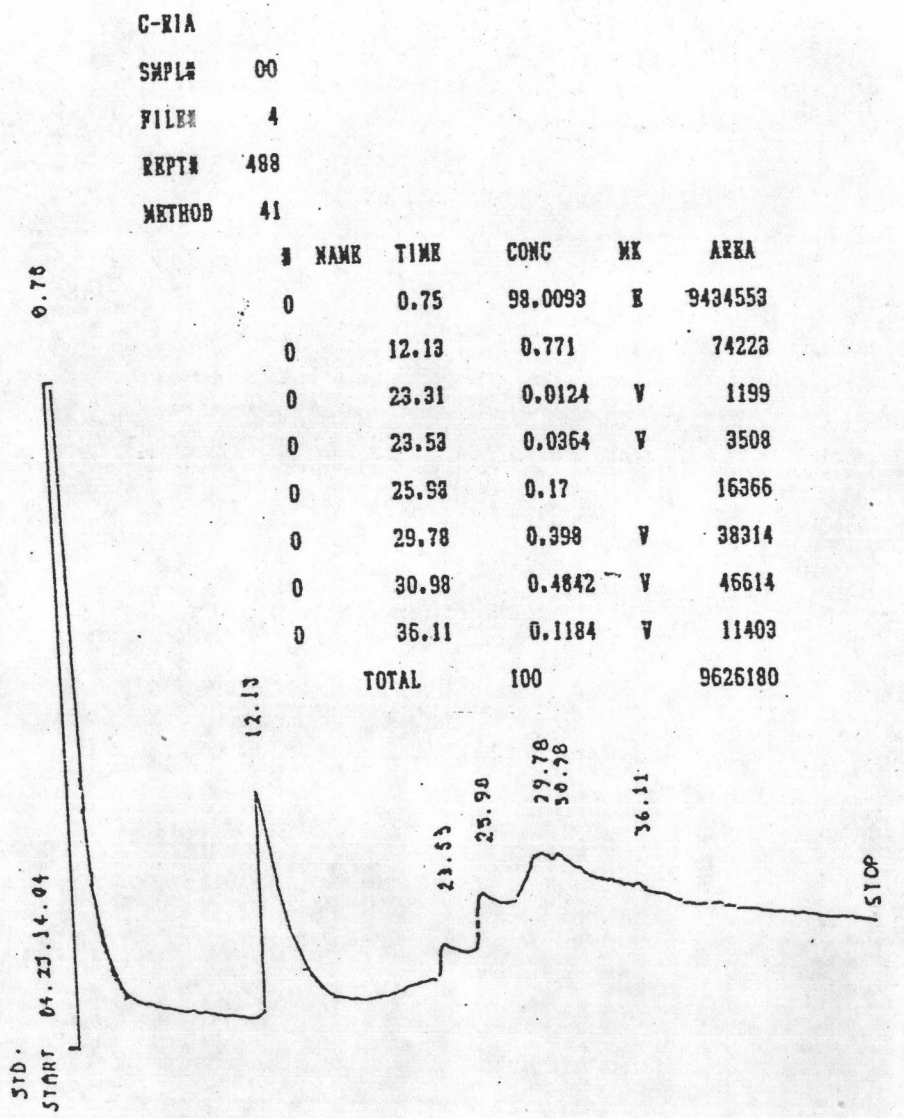
จากตารางที่ 4.2 ,กราฟในรูปที่ 4.26 และภาพถ่ายในรูป 4.27 การเจริญเติบโตของคัลลัส ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อM&S 1 μM NAA, 1 μM ไคนิตินแบบเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตเป็น 2 เท่า ของการเพาะเลี้ยงแบบไม่เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากนี้คัลลัสที่เพาะเลี้ยงแบบเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสัปดาห์ที่ 8 เนื้อเยื่อเจริญจะกลายเป็นราก ซึ่งในทฤษฎีของ Pinol และคณะ (18) กล่าวว่าถ้าเนื้อเยื่อเจริญเปลี่ยนไปเป็นอวัยวะพืช การสังเคราะห์นิโคตินจะลดลง ส่วนคัลลัสที่เพาะเลี้ยงแบบไม่เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในสัปดาห์ที่ 6, 7, และ 8 การเจริญเติบโตลดลง เนื่องจากเซลในคัลลัสมีอัตราการตายสูง

4.6 <u>ผลการทดลองเรื่องการสกัดนิโคตินจากคัลลัส</u>

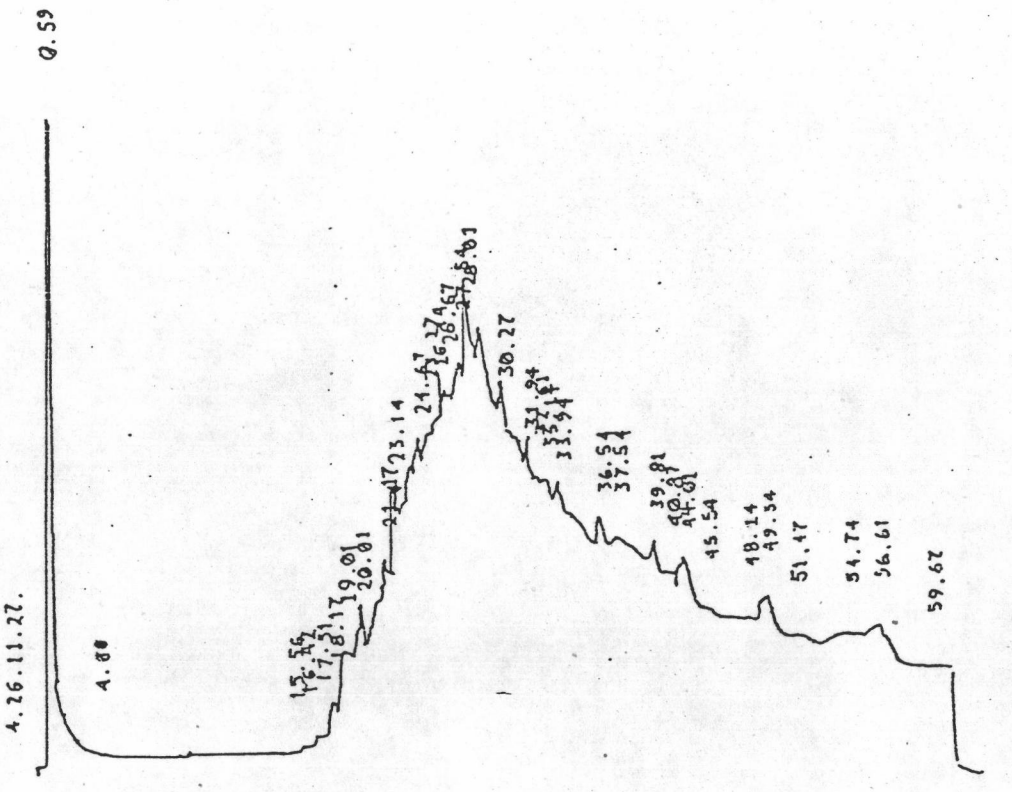
ในการสกัดนิโคตินทดลองทำตามวิธีการของ Lockwood และคณะ (16) โดยนำเอาคัลลัส 500 กรัม มาบดในเครื่องบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้อัตราเร็วในการบด 10000 ถึง 15000 รอบ/นาที นาน 15 นาที จะได้สลัดจ์นำมาผสมกับ 5% กรดอะซีติก 500 ซีซี. ทำการกวนนาน 48 ชั่วโมง แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ได้สารละลายสีน้ำตาล ทำให้เป็นด่างที่พีเอช 9 ด้วย 10% NH_4OH และแบ่งสารละลายมา 50 ซีซี.สกัดด้วย $CHCl_3$ 50 ซีซี. 3 ครั้ง จากนั้นทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศแล้วรีฟลักซ์ด้วย 2 M KOH ซึ่งละลายในแอลกอฮอล์ ณ 60 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมงแล้วสกัดด้วย $CHCl_3$ ซ้ำ

จากนั้นทำการวิเคราะห์ตรวจหานิโคตินจากสารที่สกัดได้จากคัลลัสโดยดัดแปลงจากวิธีของ Lockwood และ Essa (16) โดยใช้เครื่องแก๊สโคมาโตรกราฟ(GC) ซึ่งเริ่มต้นอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส 4 นาที และตัวโปรแกรมอัตราอุณหภูมิ(temperature rate) ให้ปรับ 6 องศาเซลเซียส ต่อ 1 นาที ไปจนถึง 250 องศาเซลเซียส แล้วฉีดนิโคตินมาตรฐาน หรือสารที่สกัดจากคัลลัสละลายในคลอโรฟอร์ม 1 ไมโครลิตร จากนั้นปรับ 6 องศาเซลเซียส ต่อ 1 นาที ไปจนถึงอุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส โดยปรับก๊าซ N_2 ให้ไหล 40 มิลลิตร/นาที

และเรนจ์(range) 10, อัตราการขยาย 2^3 จะได้โครมาโตรแกรมGCของนิโคตินมาตรฐาน และ สารที่สกัดจากคัลลัส ดังรูปที่ 4.28 และ 4.29 ตามลำดับ



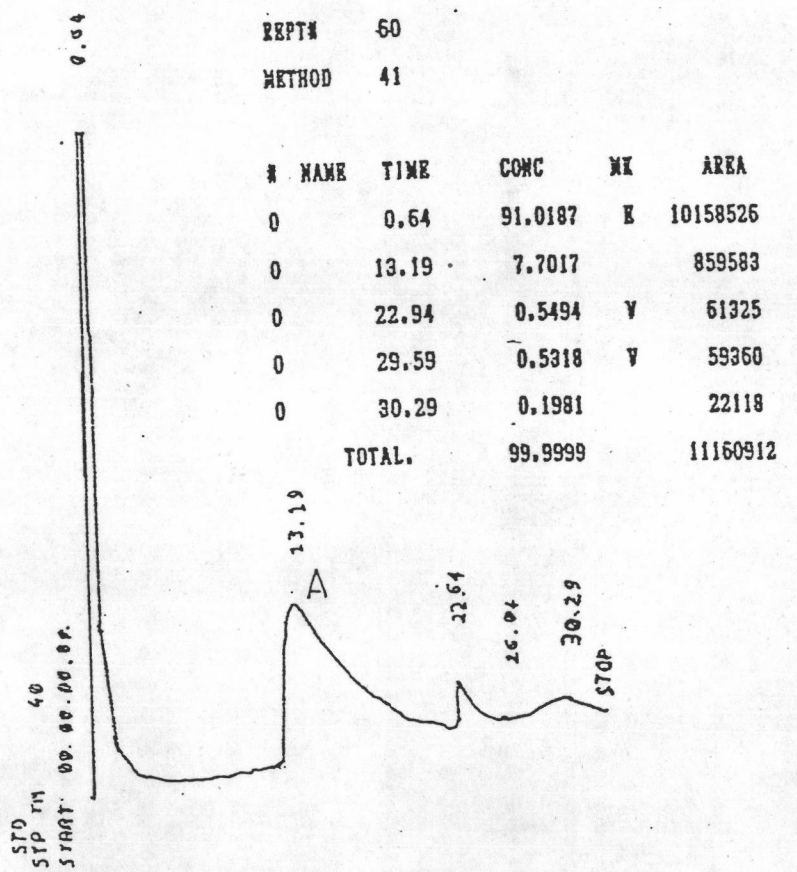
รูปที่ 4.28 โครมาโตรแกรม GCของ นิโคตินมาตรฐาน



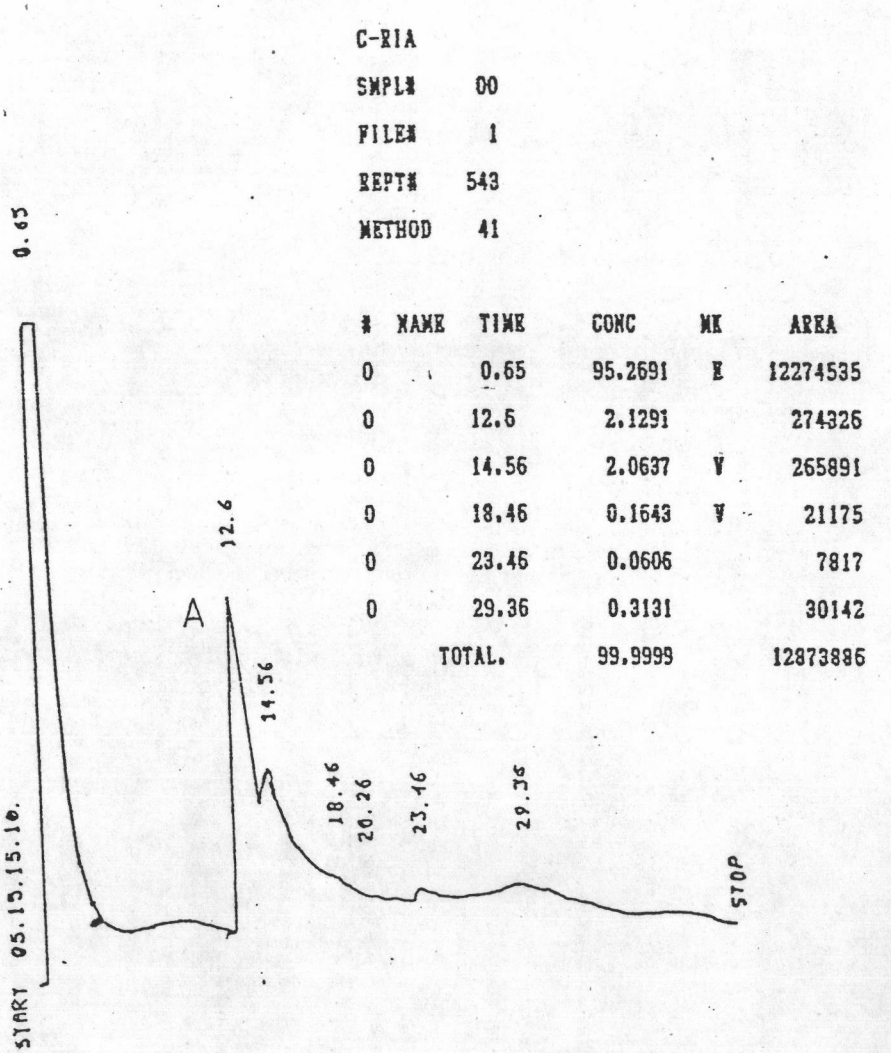
รูปที่ 4.29 โครมาโตรแกรมของนิโคตินที่สกัดจากคัลลัส

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างโครมาโตรแกรมในรูปที่ 4.28 และ 4.29 พบว่าการสกัดนิโคตินโดยใช้ $CHCl_3$ จากคัลลัส จะได้ผลผลิตข้างเคียงออกมามากมายทำให้ตรวจสอบทางคุณภาพไม่ได้

การสกัดนิโคตินโดยใช้วิธีของ Tabata และ Hiraoka (17) โดยใช้คัลลัสเนื้อเยื่อเยื่อกแข็งแห้ง 1 กรัมผสมกับ MgO 0.625 กรัม หรือ ในอัตราส่วน 8:5 ทำการกลั่นด้วยไอน้ำโดยใช้เครื่องกลั่นดังรูปที่ 3.11 ทำการกลั่นให้ปริมาณสารละลาย 270 ซีซี. ผสมกับ 0.5 N HCl 30 มิลลิลิตร จากนั้นทำการวิเคราะห์ตรวจหานิโคตินจากสารที่สกัด ได้จากคัลลัสโดยดัดแปลงจากวิธีของ lockwood และ Essa (16) ใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเงื่อนไขเช่นเดิม จะได้โครมาโตรแกรม GC ของนิโคตินมาตรฐาน และ สารที่สกัดจากคัลลัส ดังรูปที่ 4.30 และ 4.31 ตามลำดับ

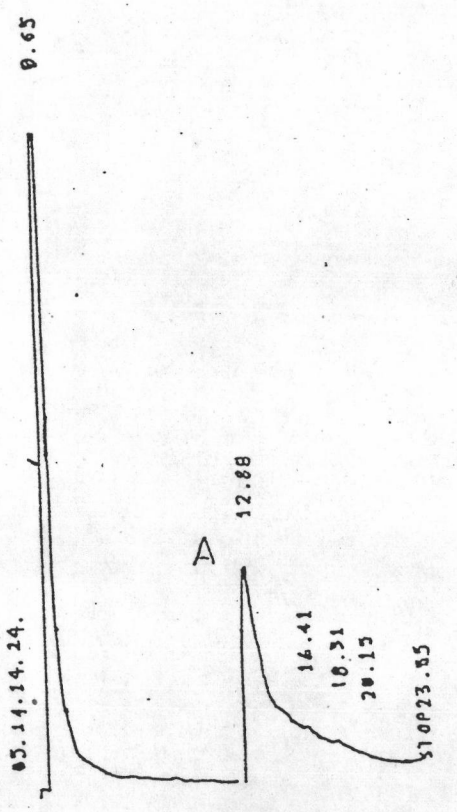


รูปที่ 4.30 โครมาโตรแกรม GCของนิโคตินมาตรฐานที่ละลายในแอลกอฮอล์



รูปที่ 4.31 โครมาโตรแกรมของนิโคตินที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำละลายในแอลกอฮอล์

เปรียบเทียบโครมาโตรแกรมในรูปที่ 4.30 และ 4.31 เพื่อให้ทราบพีคของนิโคติน จึงฉีดสารละลายที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ ผสมกับนิโคตินมาตรฐานซึ่งละลายในแอลกอฮอล์ จะได้พีคของนิโคติน อยู่ ณ ตำแหน่ง A ดังรูปที่ 4.32

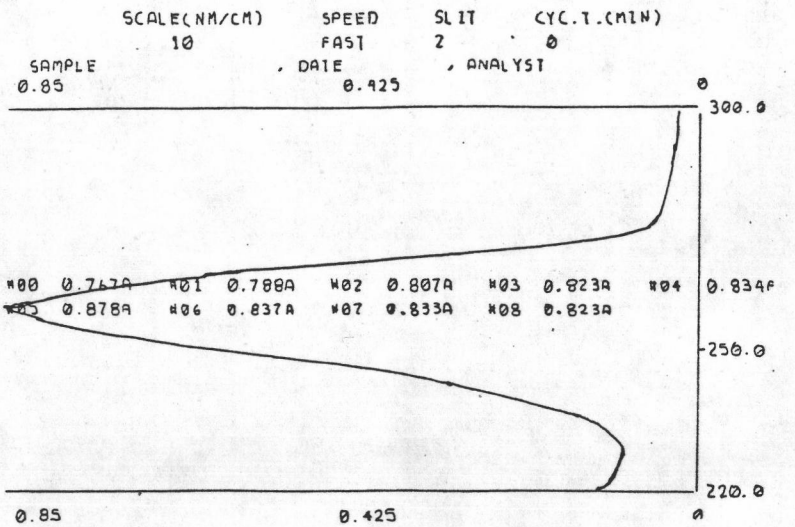


C-RIA
SMPL# 00
FILE# 1
REPT# 552
METHOD 41

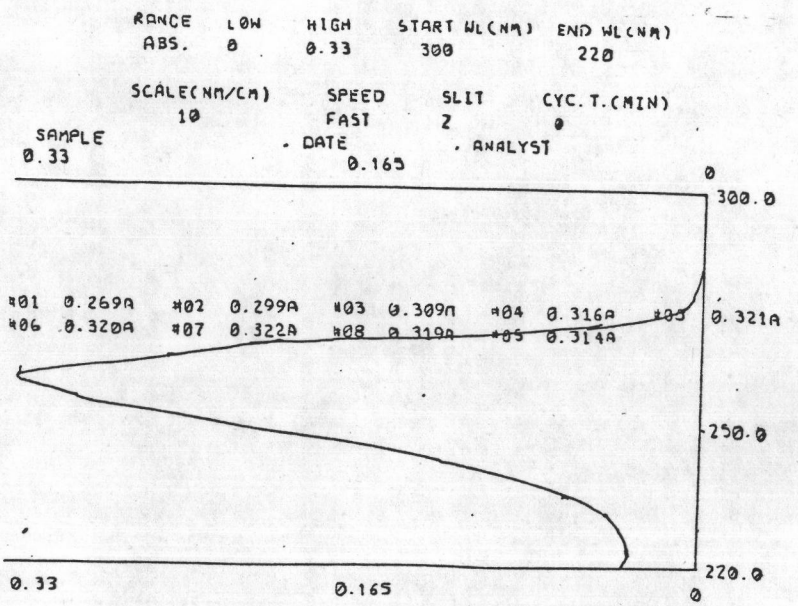
#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		0.65	87.996	E	11631726
0		12.88	8.374		1106915
0		16.41	1.6625	V	219764
0		18.31	1.0159	V	134298
0		20.15	0.7584	V	100525
0		23.55	0.1929	V	25507
		TOTAL.	99.9999		13213462

รูปที่ 4.32 โครมาโตรแกรมของสารรละลายที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำผสมกับนิโคตินมาตรฐาน ซึ่งละลายในแอลกอฮอล์

เมื่อนำสารละลายที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ ทำการตรวจสอบด้วยอัลตราไวโอเลต สเปกโตรมิเตอร์ จะได้พีคเหมือนกับนิโคตินมาตรฐานที่ผ่านกระบวนการทางเคมีแบบเดียวกัน ดังรูปที่ 4.33 และ 4.34 ตามลำดับ



รูปที่ 4.33 สเปกตรัมอัลตราไวโอเลตของสารละลายที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ



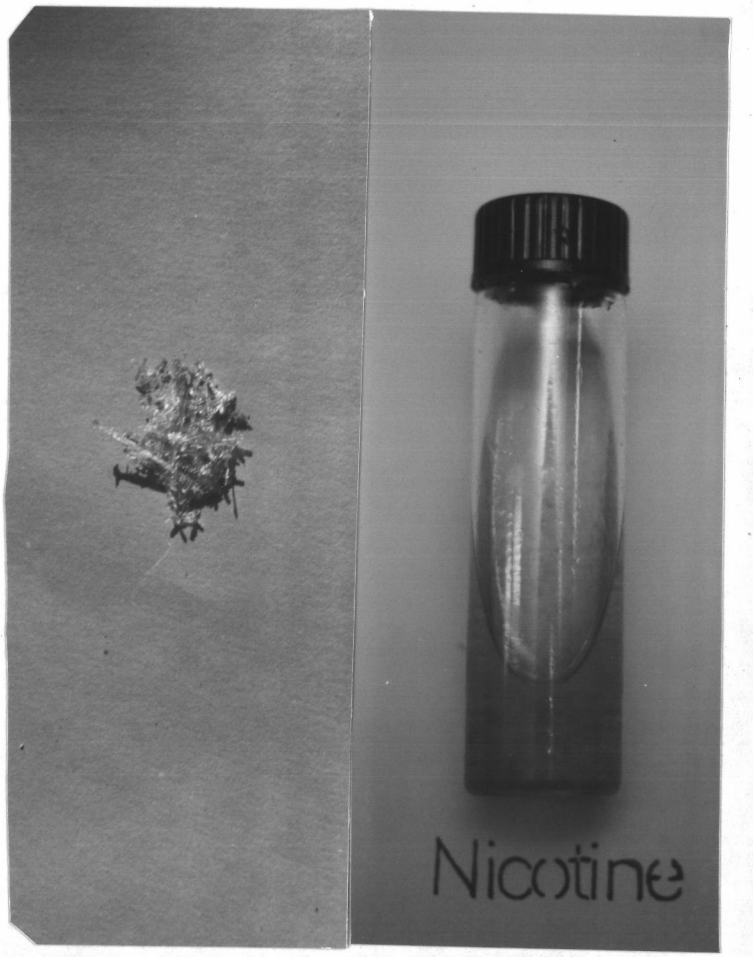
รูปที่ 4.34 สเปกตรัมอัลตราไวโอเลตของนิโคตินมาตรฐาน

ทำการวัดหาปริมาณนิโคตินด้วยอัลตราไวโอเลตสเปกโตรมิเตอร์ที่ 259 นาโมเมตร โดยจะหาปริมาณนิโคตินจากคัลลัสที่เพาะเลี้ยงบน M&S 1 μM NAA และ 1 μM ไคนิติน ที่มีนิโคตินิก และที่ไม่มีกรดนิโคตินิก(เนื่องจากคัลลัสสามารถผลิตนิโคตินขึ้นเองโดยไม่ใช้กรดนิโคตินิกจากภายนอก)จากตารางที่ 4.3 (ดูในภาคผนวก ฉ.10 หน้าที่ 168-176)

ตารางที่ 4.3 ปริมาณนิโคตินของคัลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ M&S 1 uMNAA และ 1 μMไคนิติน ทั้งที่มีนิโคตินิคและไม่มีนิโคตินิค

สัปดาห์	ปริมาณนิโคตินที่สกัดได้จากคัลลัส(มิลลิกรัม/ซีซี.)					
	แบบเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยง			แบบไม่เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยง		
	ไม่มีนิโคตินิค	มีนิโคตินิค	สุทธิ	ไม่มีนิโคตินิค	มีนิโคตินิค	สุทธิ
0	3.3807	3.3807	0.00	3.0897	3.0897	0.00
2	3.6494	4.4330	0.2612	3.5374	4.7688	0.4105
4	3.9852	7.5674	1.1941	5.0375	10.4780	1.8135
6	4.2763	6.0226	0.5821	5.7763	13.9931	2.7389

จากนั้นนำสารละลายที่กลั่นได้ทำให้เยือกแข็งแห้ง แบ่งมา 10 มิลลิกรัม ละลายน้ำ 100 ซีซี. แล้ววัดด้วยอัลตร้าไวโอเลตสเปกโตรมิเตอร์ที่ 259 นาโมเมตร ได้เป็นปริมาณนิโคตินเป็น 76.70 % หรือ นิโคตินไฮโดรคลอไรด์ 93.72% (ดูในภาคผนวก ฉ.10 หน้าที่ 177)รูปที่ 4.35



รูปที่ 4.35 นิโคตินไฮโดรคลอไรด์ที่สกัดได้

จากตารางที่ 4.3 เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างการสังเคราะห์นิโคตินจากการทดลองแบบเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และไม่เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะเห็นว่าในสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลองแบบไม่เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีปริมาณนิโคตินสูงกว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนั้นในการทดลองสังเคราะห์นิโคตินกัมมันตรังสีจะทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบไม่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะทำให้ไร้เชื้อโดยการฉายรังสี 25 กิโลเกรย์ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผ่านการฉายรังสี จะไม่มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อราในระยะเวลา 6 สัปดาห์ ซึ่งเหมาะที่จะนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่พบว่าถ้าฉายรังสีที่ 29 กิโลเกรย์ อาหาร

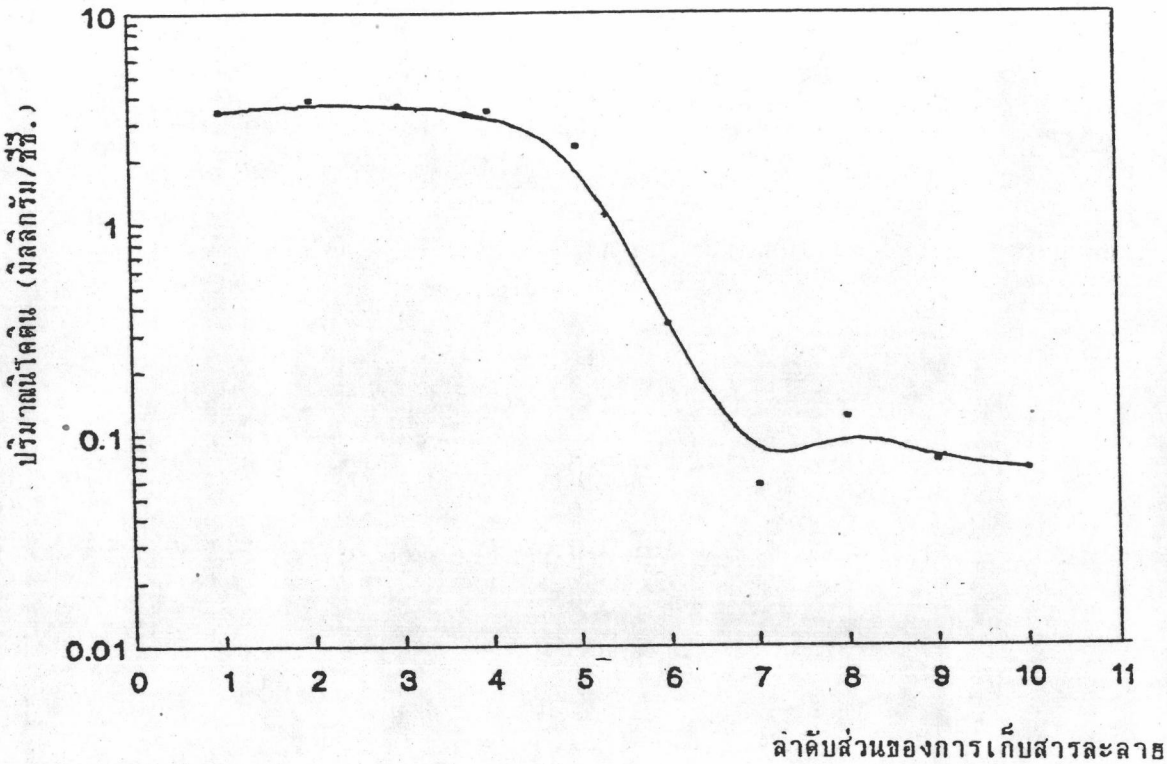
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบวุ้น ที่มีปริมาณวุ้น 0.8% ของปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ลิตร จะมีลักษณะไม่แข็งตัวไม่เหมาะนำไปเพาะเลี้ยงคัลลัส

ในการสังเคราะห์นิโคตินกัมมันตรังสีจะได้ปริมาณนิโคตินกัมมันตรังสี 4.50 มิลลิกรัม ต่อ ซีซี. และเมื่อนำสารละลายที่กลั่นได้ 2000 ซีซี. ทำให้เยื่อกแข็งแห้งจะได้สารสีน้ำตาล 0.2548±0.0108 กรัม

การเพิ่มความบริสุทธิ์นิโคตินรังสี ทำโดยใช้แยกสิ่งเจือปนออกในคอลัมน์บรรจุอะลูมินา โดยจะหาส่วนของสารละลายที่เป็นนิโคตินรังสี และมีปริมาณนิโคตินสูงสุดจากการแยกลำดับส่วน โดยนำไปวัดในเครื่องอัลตราไวโอเลตสเปกโตรมิเตอร์ ดังในตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.36(ดูในภาคผนวก ฉ.11 หน้าที่ 178-182)

ตารางที่ 4.4 ลำดับส่วนปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากอลูมินาคลอลัมน์ และวิเคราะห์ปริมาณนิโคตินด้วยเครื่องวัดอัลตราไวโอเลตสเปกโตรมิเตอร์

ลำดับส่วนที่เก็บ	สารละลายจากคลอลัมน์	ปริมาณนิโคติน (มิลลิลิกรัม/ซีซี.)
1	สารละลายที่กลั่นแล้ว	3.3530
2	สารละลายที่กลั่นแล้ว	3.7964
3	สารละลายที่กลั่นแล้ว	3.5763
4	สารละลายที่กลั่นแล้ว	3.3926
5	สารละลายที่กลั่น/เมทานอล	2.3194
6	เมทานอล	0.3344
7	เมทานอล	0.0577
8	เมทานอล	0.1214
9	เมทานอล	0.0759
10	เมทานอล	0.0683

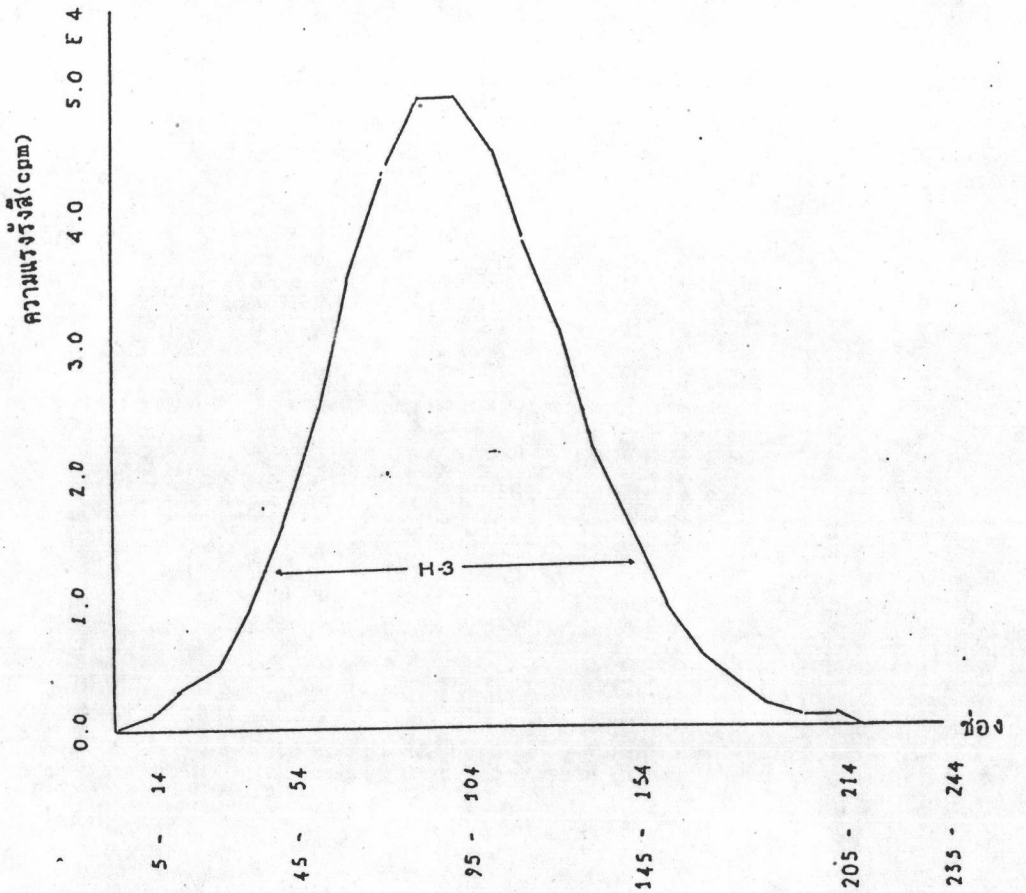


รูปที่ 4.36 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างลำดับส่วน(fraction)ที่เก็บ และปริมาณนิโคติน กัมมันตรังสี

จากตารางที่ 4.4 และกราฟรูปที่ 4.36 ปรากฏว่าในลำดับส่วน(fraction)ที่ 2 มีปริมาณนิโคตินสูง จึงนำเอาลำดับส่วนที่ 2 กรองผ่านมิลลิพอร์ขนาด 0.22 ไมครอน โดยกรองเอา Al_2O_3 ที่หลุดออกมาจากอะลูมินั่มคอลัมน์แล้วจึงนำสารละลายไป ทำให้แห้งโดยวิธีเยือกแข็ง แบ่งสารสีน้ำตาลมา 10 มิลลิกรัม ละลายน้ำ 100 ซีซี. แล้ววัดด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลต สเปกโตรมิเตอร์ที่ 259 นาโนเมตร ได้เป็นปริมาณนิโคติน 72.78% หรือนิโคตินไฮโดรคลอไรด์ 88.94% (ดูในภาคผนวก ฉ.11 หน้าที่ 182)ดังรูปที่ 4.37

รูปที่ 4.37 นิโคตินไฮโดรครอไรด์ H-3

นำนิโคตินกัมมันตรังสี 1 มิลลิกรัม 2 ตัวอย่าง นำแต่ละตัวอย่างมาละลายในเตทตราไฮโดรฟูราน 5 มิลลิลิตร และสารละลายคอกเทล 15 มิลลิลิตร ไปวัดรังสีตามวิธีที่กล่าวมา ได้นิโคตินกัมมันตรังสี 3071.24 CPM/มิลลิกรัมของนิโคตินกัมมันตรังสี (ดูในภาคผนวก ฉ.10 หน้าที่ 183) นอกจากนี้นำนิโคตินกัมมันตรังสีที่ละลายในตัวเปล่งแสงนำไปวัดด้วยเครื่องลิควิดซินทิลเลชันที่ต่อกับเครื่องวิเคราะห์สัญญาณแบบหลายช่อง ปรากฏว่านิโคตินกัมมันตรังสีประกอบไปด้วยต้นกำเนิดรังสีเบตา คือ ทริเทียม เท่านั้นดังในรูป 4.38



รูปที่ 4.38 สเปกตรัมของนิโคตินทริเทียมที่สังเคราะห์ขึ้นเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องลิควิดซินทิลเลชันที่ต่อกับเครื่องวิเคราะห์สัญญาณแบบหลายช่อง

จากนั้นนำนิโคตินกัมมันตรังสีทำการตรวจสอบด้วยหัววัดรังสีแกมมา(HPGe) เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของต้นกำเนิดที่ให้รังสีแกมมา ผลของการตรวจสอบไม่ปรากฏมีต้นกำเนิดรังสีแกมมา