หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

3.1.1 อุปกรณ์

ตู้ปลอดเชื้อแบบ Horizontal laminar flow รุ่น H1 หจก.แลบ เซอร์วิส , Thailand

เครื่องเขย่า(Shaker) รุ่น G-10 บริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., U.S.A.

เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2100 บริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., U.S.A.

เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที หจก. เซค ซายน์ เอน.

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น T-42k บริษัท Kontron instruments, Taiwan

เครื่องผสมสาร(vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries, Inc., U.S.A.

เครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring tensiometer) รุ่น K6 บริษัท Kruss, Germany

แผ่นโครมาโตกราฟี่ทินแลย์ (analytical Thin layer Chromatography) silica gel 60 20x2 mm บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

แผ่นโครมาโตกราฟี่ทินแลย์แบบแยกสาร (preparative Thin layer Chromatography) silica gel 60 20x20 mm บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 บริษัท Eutec Cybermetics, Singapore

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer) รุ่น UV-160 บริษัท Shimadzu, Japan

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตรกราฟี (High Performance Liquid Chromatogragph :HPLC) รุ่น LC-3A บริษัท Shimadzu, Japan

- คอลัมน์ Reverse phase Lichrocart – C18 endcapped บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- เครื่องประมวลผล (Integrator) รุ่น C-R1A บริษัท Shimadzu, Japan
- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV detector) รุ่น spectromonitor 4100 บริษัท LDC,

เครื่องอีแวปเปอร์เรเตอร์ (evaporator) รุ่น R-300 บริษัท BUCHI, Switzerland

เครื่องวิเคราะห์ CHN รุ่น PE2400 SERIES II บริษัท PERKIN LEMER

เครื่องแมสสเปคโทรมิเตอร์ รุ่น LCQ บริษัท Finnigan Inc., U.S.A.

3.1.2 เคมีภัณฑ์

สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

แบคโตเปปโตน (bacto peptone) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

น้ำมันปาล์ม บริษัท มรกตอินดัสตรีส์ จำกัด, ประเทศไทย

น้ำมันถั่วเหลือง บริษัท อุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด, ประเทศไทย

น้ำมันมะกอก บริษัท ซีโน-แปซิฟิก เทรดดิ้ง จำกัด, ประเทศไทย

น้ำมันดิบ (crude oil) ห้องทดลอง Prof.Imanaka, Japan

พาราฟิน ออย (Paraffin oil) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

คลอโรฟอร์ม (Chloroform) บริษัท BDH laboratory supplies, England

เมทานอล (Methanol) บริษัท BDH laboratory supplies, England

เอทานอล (Ethanol) บริษัท BDH laboratory supplies, England

ไดคลอโร มีเทน (Dichloro methane) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

อีเทอร์ (Ether) บริษัท BDH laboratory supplies, England

เอทิล อะซิเตด (Ethyl acetate) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

ไซโคลเฮ็กเซน (Cyclohexane) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

เฮ็กเซน (Hexane) บริษัท Lab-Scan, ประเทศไทย

1- อ็อกตะนอล (1-Octanol) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

โทลูอีน (Toluene) บริษัท BDH laboratory supplies, England

ไอโซเอมิล อะซิเตด (Isoamyl aectate) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

ไซลีน (Xylene) บริษัท BDH laboratory supplies, England

เอทิล เมทิล คีโตน (Ethyl methyl ketone) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

เบนซิน (Benzene) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

ดีเซล (Diezel) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

อะซิโตรไนไตรท์ (Acetronitile) HPLC Grade บริษัท Lab-Scan, ประเทศไทย

น้ำ HPLC Grade บริษัท Lab-Scan, Thailand

กรดไตรฟูลออโรอะซีติก (Trifluoroacetic acid) HPLC Grade บริษัท Fluka, Switzerland

ไอโอดีนซนิดเกล็ด บริษัท Univar, U.S.A.

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

ไทรทอน เอ็กซ์-100 (Triton X-100) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

ทวีน 80 (Tween 80) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

ซีทิลไพริดีเนียม คลอไรด์ (Cetylpyridinium chloride, CPC) บริษัท J.T.Baker, U.S.A.

แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) บริษัท J.T.Baker, U.S.A.

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) บริษัท J.T.Baker, U.S.A.

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท J.T.Baker, U.S.A.

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท J.T.Baker, U.S.A.

โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) บริษัท BDH laboratory supplies, England

โซเดียมโมลิบเดต ($Na_2MoO_4.2H_2O$) บริษัท BDH laboratory supplies, England

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) บริษัท J.T.Baker, U.S.A.

โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท BDH laboratory supplies, England

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) บริษัท BDH laboratory supplies, England

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) บริษัท BDH laboratory supplies, England

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$) บริษัท J.T.Baker, U.S.A.

ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) บริษัท J.T.Baker, U.S.A.

เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

โคบอลคลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

กรดซัลฟลูริก (H_2SO_4) บริษัท BDH laboratory supplies, England

กรดไฮโดคลอริก (HCl) บริษัท BDH laboratory supplies, England

กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) บริษัท BDH laboratory supplies, England

กรดบอริก (H_3BO_3) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

นินไฮดริน (Ninhydrin) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

แอลฟา-แนฟทอล (α-naphtol) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

อีดีทีเอ (EDTA) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A.

แคลเซียม-แพนโททีเนต (Calcium-Pantothenate) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A.

ไบโอติน (Biotin) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A.

กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (*p*-aminobenzoic acid) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A.

ไพริดอกซีน-ไฮโดคลอไรด์ (Pyridoxine-HCl) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A.

ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A.

ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A.

ทริสมา เบส (Trisma Base) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A.

ซิสเทอีน (cystein) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A.

น้ำตาลแรมโนส (L-rhamnose) บริษัท Fluka, Switzerland

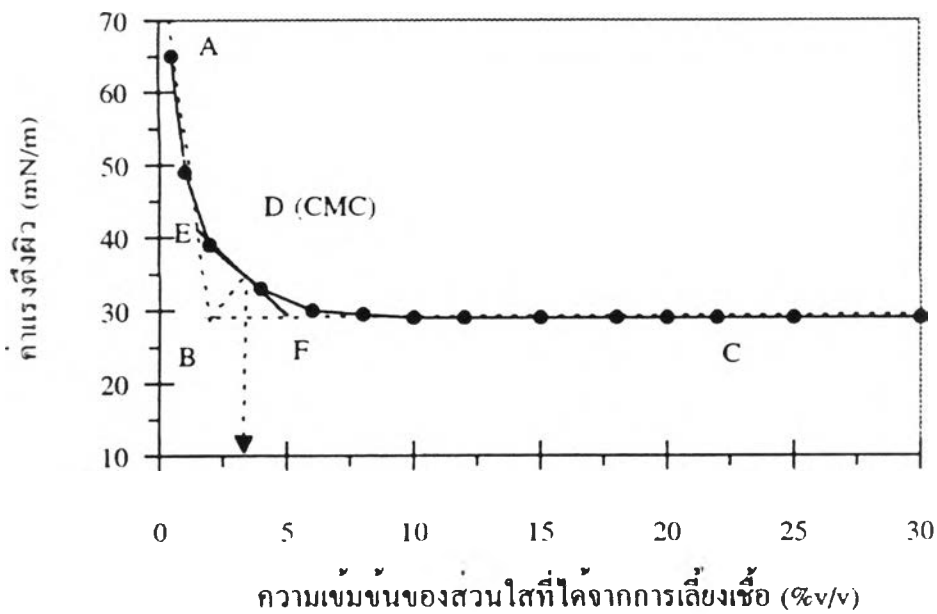
3.2 การตรวจสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.2.1 การวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension)

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออก โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 ^{O}C ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าแรงตึงผิวโดยวิธี Du Nuoy ring method ด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Ring tensiometer) แสดงหลักการและวิธีการใช้ในภาคผนวก ค

3.2.2 การหาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (critical micelle concentration)

การหาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ในการทดลองนี้ เป็นการวัดหาค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเทียบกับความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์โดยนำส่วนน้ำใสจากการเลี้ยง *Pseudomonas* sp. A41 และ สารบริสุทธิ์บางส่วน ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นโดยถ้าเป็นน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรรวมทั้งหมดส่วนสารบริสุทธิ์บางส่วนจะเป็นความเข้มข้นมีหน่วยเป็นมก.ต่อมล. แล้ววัดค่าแรงตึงผิว หาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ เขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและความเข้มข้นของส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อหรือสารบริสุทธิ์บางส่วนตามวิธีของ Sheppard และ Mulligan (1987)



รูปที่ 3.1 วิธีการหาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อหลังจากทำการเจือจางแล้ว

การหาค่า CMC ได้จากการคำนวณหาเส้นสัมผัส AB, BC และหาค่าจุดตัด B ด้วยสมการการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) เมื่อกำหนดให้

เส้นสัมผัส AB : $y_1 = b_1x_1 + a_1$

เส้นสัมผัส BC : $y_2 = b_2x_2 + a_2$

เมื่อเกิดจุดตัด B จะได้

$$b_1x_1 + a_1 = b_2x_2 + a_2 \qquad \text{เมื่อ } y_1 = y_2$$

$$b_1x_1 - b_2x_2 = a_2 - a_1$$

$$x(b_1 - b_2) = a_2 - a_1 \qquad \text{เมื่อ } x_1 = x_2$$

$$x = (a_2 - a_1)/(b_1 - b_2)$$

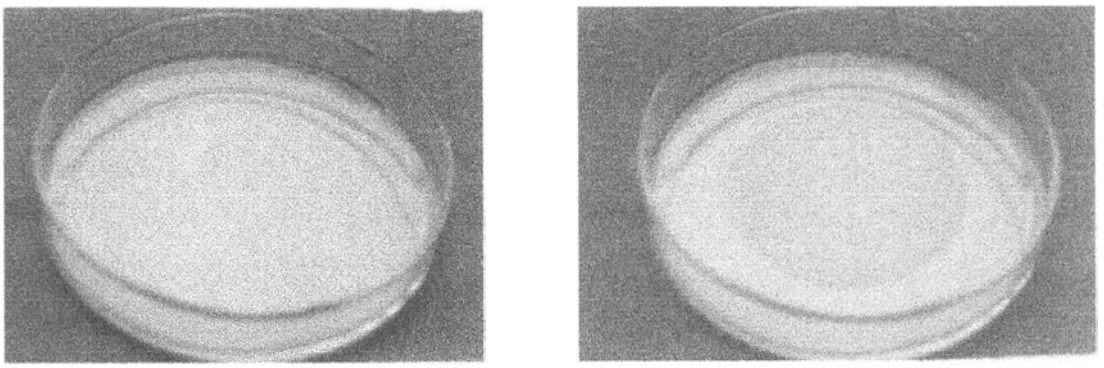
เพราะฉะนั้น จุดตัด B เท่ากับ $(a_2 - a_1)/(b_1 - b_2)$

เมื่อลากเส้นตรง BD ผ่านจุด B ให้ตั้งฉากกับเส้นสัมผัส EF ที่จุด D แล้วลากมาตัดแกน X ค่าที่ได้คือค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ [Critical Micelle Concentration (CMC)] และเมื่อลากมาตัดแกน Y ค่าที่ได้คือค่าแรงตึงผิว ณ จุดของการเกิดไมเซลล์ (γCMC) และความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (CMC^{-1}) คือส่วนกลับของค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (100/CMC)

3.2.3 การวัดการกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement test) ตามวิธีของ Morikawa และคณะ (1993)

ตวงน้ำ 40 มล. ลงในจานแก้วเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มม.หยดน้ำมันดิบปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของน้ำจะเกิดเป็นแผ่นฟิล์มแผ่ทั่วผิวน้ำ จากนั้นหยดตัวอย่างที่ได้จากการเจือจางด้วยด้วย 50 มิลลิโมลาร์ของทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8.0 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นฟิล์มของน้ำมันดิบ สังเกตวงกลมของการกระจายตัวของน้ำมันดิบ ดังรูปที่ 3.2

ก.ก่อนการกระจายน้ำมัน ข. หลังจากหยดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ



รูปที่ 3.2 แสดงวิธีการกระจายน้ำ (Morikawa และคณะ, 1993)

การวัดความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางเพื่อนำไปคำนวณหาพื้นที่ของการกระจายน้ำมันดังนี้

พื้นที่วงกลมของการกระจายน้ำมัน= πr^2

r: รัศมีของพื้นที่วงกลมของการกระจายน้ำมัน

หมายเหตุ ตัวอย่างที่ใช้วัดการกระจายตัวของน้ำมันให้มีความเจือจาง (dilution factor) เท่ากัน เนื่องจากค่าการกระจายตัวของน้ำมันไม่สัมพันธ์กับค่าความเจือจาง

3.3 การวัดการเพิ่มจำนวนของเชื้อ โดยการหาน้ำหนักแห้ง

นำน้ำเลี้ยงเชื้อ 40 มล. มาปั่นแยกเซลล์ออกโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที 20 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นแล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง นำเซลล์ที่แยกได้ใส่ถ้วยฟอร์ยที่ทราบน้ำหนักแห้งแน่นอนไปอบที่ 60 ^{o}C 12 ชั่วโมง นำออกมาพักในโถเก็บความชื้นจนเย็นแล้วนำไปชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียดจนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งมีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

3.4 การหาปริมาณน้ำตาลแรมโนสตามวิธีของ Dische และ Shettles (1948)

นำตัวอย่างมาเจือจางในความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มล. ผสมกับกรดซัลฟิวริกที่มีอัตราส่วน 6 ต่อน้ำกลั่น 1 ส่วนในปริมาตร 4.5 มล. (ก่อนนำมาผสมกันนำทั้งตัวอย่างและกรดซัลฟิวริกมาแช่ในอ่างน้ำแข็ง) เขย่าในเครื่องผสมสารแล้วต้มในน้ำเดือด 10 นาที จากนั้นเติม ซีสเทอีน(3%) ปริมาตร 0.2 มล. บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืนแล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ 396 นาโนเมตร แล้วลบด้วยค่าดูดกลืนแสงที่ 427 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาค่าน้ำตาลแรมโน สเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ง)

3.5 หาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41

3.5.1 หาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เตรียมหัวเชื้อโดยถ่าย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 บนอาหารแข็งนิวเตรียนท์ในหลอดเอียง บ่มที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายลงอาหารเหลวกำหนดสูตร (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.2) ปริมาตร 50 มล.ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. แหล่งไนโตรเจนในที่นี้ คือ แอมโมเนียมไนเตรท ซึ่งแปรปริมาณไนโตรเจนตั้งแต่ 0.14% (w/v) โดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนมีปริมาณคาร์บอนเท่ากับ 1.44% (w/v) (อารีย์ กังฉิน, 2542) น้ำมันปาล์มที่ใช้มีปริมาณคาร์บอนเท่ากับ 71.907% (w/v) วิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) แล้วบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$ 2 $^{\circ}$C) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง มีค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ประมาณ 1 และใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิต

ถ่ายหัวเชื้อ 4% (v/v) ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่โดยมีแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งแปรปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.07, 0.14, 0.21 และ 0.28 % (w/v) ใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีปริมาณคาร์บอนเท่ากับ 1.44% (w/v) ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำส่วนตะกอนมาวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง ตามข้อ 3.3 นำส่วนน้ำในที่ปลอดเซลล์ทดสอบหาปริมาณน้ำตาลแรมโนสตามข้อ 3.4, หาค่า CMC ตามข้อ 3.2.2 และวัดการกระจายน้ำมันตามข้อ 3.2.3

3.5.2 หาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต

เตรียมหัวเชื้อตามข้อ 3.5.1 โดยแปรอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 2.07, 6.14, 10.29 และ 14.36 ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนคงที่เท่ากับ 0.14 % (w/v) ถ่ายหัวเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1 ที่ 660 นาโนเมตร 4%(v/v) ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตรตามอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนตามข้างต้น นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$ 2 $^{\circ}$C) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นแยกเซลล์ที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำส่วนตะกอนมาวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง ตามข้อ 3.3 นำส่วนน้ำในที่ปลอดเซลล์ทดสอบหาปริมาณน้ำตาลแรมโนสตามข้อ 3.4, หาค่า CMC ตามข้อ 3.2.2 และวัดการกระจายน้ำมันตามข้อ 3.2.3

3.5.3 หาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เตรียมหัวเชื้อตามข้อ 3.5.1 โดยอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10.29 ถ่ายหัวเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1 ที่ 660 นาโนเมตร 4%(v/v) ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตรตามอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนตามข้างต้น นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่

อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 ^{o}C) เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นแยกเซลล์ที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำส่วนตะกอนมาวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง ตามข้อ 3.3 นำส่วนน้ำในที่ปลอดเซลล์ทดสอบหาปริมาณน้ำตาลแรมโนสตามข้อ 3.4, หาค่า CMC ตามข้อ 3.2.2 และวัดการกระจายน้ำมันตามข้อ 3.2.3

3.6 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและทำบริสุทธิ์บางส่วน

3.6.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามภาวะที่เหมาะสม

เตรียมหัวเชื้อตามข้อ 3.5.1 โดยอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10.29 ถ่ายหัวเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1 ที่ 660 นาโนเมตร 4%(v/v) ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตรตามอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนตามข้างต้นปริมาณ 10 ลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 ^{o}C) เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นแยกเซลล์ที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ได้ส่วนน้ำใสที่ปลอดเซลล์

3.6.2 ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วน

นำน้ำใสที่ปลอดเซลล์มาตกตะกอนด้วย 6 N HCl จนมีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 2 ทิ้งข้ามคืนที่ 4 ^{o}C แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 10 ^{o}C อัตราเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้ล้างในน้ำกลั่นที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 2 แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 10 ^{o}C อัตราเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาทีทำซ้ำ 2 ครั้ง (Cooper และคณะ, 1981) แล้วนำตะกอนมาละลายในทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 จนตะกอนละลายหมดพอดี

นำมาสกัดโดยใช้กรวยแยกด้วยคลอโรฟอร์มและเอทานอลด้วยอัตราส่วน 2ต่อ1 เขย่าเป็นเวลา 3 นาที ทิ้งไว้ให้แยกชั้นจะเห็นได้ว่าชั้นล่างจะเป็นชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ไขชั้นล่างเก็บไว้สกัดซ้ำ 3 ครั้ง นำตัวทำละลายอินทรีย์ที่สกัดมากำจัดน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำโดยใส่โซเดียมซัลเฟตจนกว่าจะเห็นตะกอนสีขาว(น้ำออกจากตัวทำละลายอินทรีย์หมด) กรองแยกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต นำตัวทำละลายอินทรีย์ที่ปราศจากน้ำมาแยกออกด้วยเครื่องอีแวปเปอร์เรเตอร์ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 ^{o}C ได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน ซึ่งมีสีน้ำตาลไหม้ เหนียวหนืด

3.7 ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของสารลดแรงตึงผิวที่บริสุทธิ์บางส่วน

3.7.1 หาค่า Critical Micelle Concentration (CMC) ตามวิธี Sheppard และ Mulligan (1987) โดยนำสารลดแรงตึงผิวที่บริสุทธิ์บางซึ่งผลิตได้ 100 มก. ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 แล้วนำมาเจือจางตั้งแต่ 0.00001 – 10 มก.ต่อมล.

นำแต่ละความเข้มข้นมาวัดค่าแรงตึงผิวแล้วมาเขียนกราฟระหว่าง log ของความเข้มข้นและค่าแรงตึงผิวหาจุด CMC

3.7.2 หาค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสม

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก 3.6.2 ปริมาณ 100 มก. มาละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์ซึ่งค่าความเป็นกรดเป็นด่างตั้งแต่ 2-12 ปริมาตร 10 มล. นำมาเจือจางเป็น 100 เท่า ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์มีความเป็นกรดเป็นด่างตั้งแต่ 2-12 แล้วการวัดการกระจายน้ำมันตามข้อ 3.2.3และค่าแรงตึงผิวตามข้อ 3.2.2

3.7.3 ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก 3.6.2 ปริมาณ 100 มก. มาละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์ซึ่งค่าความเป็นกรดเป็นด่างตั้งแต่ 2-12 ปริมาตร 10 มล.นำมาทดสอบทุกๆ 10 วันเป็นเวลา 6 เดือน โดยนำมาเจือจางเป็น 100 เท่า ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 แล้วการวัดการกระจายน้ำมันตามข้อ 3.2.3และค่าแรงตึงผิวตามข้อ 3.2.2

3.7.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก 3.6.2 ปริมาณ 100 มก. มาละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 ปริมาตร 10 มล. มาไว้ในอุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 4 – 100 ^{o}C แล้วทดสอบการกระจายน้ำมันโดยมาเจือจางเป็น 100 เท่า ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 ตามข้อ 3.2.3

3.7.5 ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่ออุณหภูมิ

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก 3.6.2 ปริมาณ 100 มก. มาละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 ปริมาตร 10 มล. มาไว้ที่อุณหภูมิที่ 100 ^{o}C นำมาทดสอบทุกๆ 2 ชั่วโมงเป็นเวลา 15 ชั่วโมงนำมาเจือจางเป็น 100 เท่า ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 แล้วการวัดการกระจายน้ำมันตามข้อ 3.2.3และค่าแรงตึงผิวตามข้อ 3.2.2 จากนั้นนำมาทดสอบที่อุณหภูมิ 120 ^{o}C โดยเครื่องทำให้ปลอดเชื้อด้วยไอน้ำโดยแปรเวลาเป็น 20, 30 และ 40 นาที แล้วนำมาเจือจางเป็น 100 เท่า ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 แล้วการวัดการกระจายน้ำมันตามข้อ 3.2.3และค่าแรงตึงผิวตามข้อ 3.2.2

3.7.6 ความเข้มข้นของ NaCl ต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก 3.6.2 ปริมาณ 100 มก. มาละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 ซึ่งแปรความเข้มข้นของ

NaCl ตั้งแต่ 0.5-5 %(w/v) ปริมาตร 10 มล. นำมาทดสอบทุกๆ 10 วันเป็นเวลา 6 เดือน โดยนำมาเจือจางเป็น 100 เท่า ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 และแปรความเข้มข้นของ NaCl ตั้งแต่ 0.5-5 %(w/v) แล้วการวัดการกระจายน้ำมันตามข้อ 3.2.3และค่าแรงตึงผิวตามข้อ 3.2.2

3.7.7 ความเสถียรต่อความเข้มข้นของ NaCl ต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก 3.6.2 ปริมาณ 100 มก. มาละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 ซึ่งแปรความเข้มข้นของ NaCl ตั้งแต่ 0.5-5 %(w/v) ปริมาตร 10 มล. นำมาทดสอบทุกๆ 10 วันเป็นเวลา 6 เดือน โดยนำมาเจือจางเป็น 100 เท่า ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 แล้วการวัดการกระจายน้ำมันตามข้อ 3.2.3และค่าแรงตึงผิวตามข้อ 3.2.2

3.7.8 หาค่าอิมัลชั่น อินเด็กซ์ (emulsion index)

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์จากข้อ 3.6.1 และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก 3.6.2 ปริมาณ 10 มก.ต่อมล.ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 ปริมาตร 4 มล.ใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 15 มล.แล้วผสมกับสารละลายอินทรีย์ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตด ไซโคลเฮ็กเซน เฮ็กเซน โทลูอีน ไซลีน เอทิลเมทิลคีโตน คลอโรฟอร์ม และเบนซิน และน้ำมันได้แก่ น้ำมันมะกอก, ฟาราฟิน ออย, น้ำมันก๊าด, น้ำมันปาล์ม และ น้ำมันถั่วเหลือง ปริมาตร 6 มล. ผสมด้วยเครื่องผสมสารนาน 5 นาที วัดอิมัลชั่น อินเด็กซ์ที่เวลา 1, 7, 30 และ 90 วัน การวัดอิมัลชั่น อินเด็กซ์ตามวิธีของ Patel และDesai,1993 ทำได้โดยหาอัตราส่วนระหว่างอิมัลชั่นซึ่งจะมีลักษณะเป็นครีมขาวและความสูงของของเหลวทั้งหมด จากการคำนวณดังนี้

$$\text{emulsion index} = \frac{h_E}{h_S} \times 100$$

h_E = ความสูงของอิมัลชั่น

h_S = ความสูงของของเหลวทั้งหมด

3.7.9 หาสมบัติการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วน

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก 3.6.2 ปริมาณ 50 มก. มาละลายใน เมทานอล, เอทานอล, เฮ็กเซน, คลอโรฟอร์ม, อีเทอร์, เอทิล อะซิเตด และ 0.5 โมล ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 ปริมาตร 10 มล. แล้วเจือจางให้ได้ 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 และ 05 มก.ต่อมล. ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงแล้วสังเกตว่ามีตะกอนหรือแยกชั้นหรือไม่ ถ้าได้สารละลายใสไม่มีตะกอนแสดงว่าละลายได้หมด

3.7.10 การกระจายน้ำมันระหว่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) เปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (synthetic surfactant)

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก 3.6.2 และสารลดแรงตึงผิวเคมีได้แก่ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS), ไทรทอน เอ็กซ์-100 (triton X-100), ทวีน 80 (tween 80), ซีทิลไพริดีเนียม คลอไรด์ (cetylpyridinium chloride, CPC) และสารกระจายน้ำมัน (Noble Dispersant) ที่ใช้ในกองทัพเรือ ปริมาณ 20 มก. มาละลายใน 0.5 โมล ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10-20,000 มก.ต่อลิตร จากนั้นวัดการกระจายน้ำมันตามข้อ 3.2.3

3.7.11 การตรวจสอบชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี analytical TLC

วิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยนินไฮดริน (Haba และคณะ, 2000) โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนมา 10 มก. ละลายในคลอโรฟอร์ม 1 มล. Spot ลงบนแผ่น TLC 1 ไมโครลิตรนำไปจุ่มในแท้งค์ที่อิ่มตัวไปด้วยไอของเฟสเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม 65 ส่วน, เมทานอล 25 ส่วน และ น้ำ 4 ส่วน เมื่อเฟสเคลื่อนที่เคลื่อนบนแผ่น TCL จนเกือบสุด(เหลือขอบประมาณ 0.5 มม.) นำออกมาแล้วทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ควัน พ่นด้วย 0.5% นินไฮดรินในอะซิโตนนำไปอบที่ 60 ^{o}C 30 นาที ปรากฏจุดสีม่วงถ้าพบกรดอะมิโน

วิเคราะห์แรมโนลิปิดด้วยสารละลายโมลิส (Arino และคณะ, 1996) โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนมา 40 มก. ละลายในคลอโรฟอร์ม 0.5 มล. Spot ลงบนแผ่น TLC 1 ไมโครลิตรนำไปจุ่มในแท้งค์ที่อิ่มตัวไปด้วยไอของเฟสเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม 65 ส่วน, เมทานอล 25 ส่วน และ น้ำ 4 ส่วน เมื่อเฟสเคลื่อนที่เคลื่อนบนแผ่น TCL จนเกือบสุด(เหลือขอบประมาณ 0.5 มม.) นำออกมาแล้วทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ควัน พ่นด้วยสารละลายโมลิส(ภาคผนวก ข) ทิ้งไว้สักพักจะปรากฏจุดสีเขียวถ้าพบแรมโนลิปิด

3 7.12 เปรียบเทียบปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ระหว่างน้ำมันปาล์มและน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวกำหนดสูตรตามภาคผนวก ก แต่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร (อารีย์ กังฉิน, 2542) จากนั้นผลิตแล้วทำให้บริสุทธิ์ตามข้อ 3.6.1 และ 3.6.2 ตามลำดับ เมื่อได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนที่ใช้น้ำมันปาล์มและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนนำมาประมาณ 40 มก.ต่อมล.ในคลอโรฟอร์มมาทำ TLC ตามข้อ3.7.11เปรียบเทียบกัน และ นำมาหาปริมาณน้ำตาลแรมโนสตามข้อ 3.4 นำผลที่ได้มาคำนวณหา production yield

3.8 การทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธีโครมาโตกราฟี

3.8.1 ทำให้บริสุทธิ์ด้วยแผ่น preparative TLC

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจาก 3.6.2 ปริมาณ 25 มก. ละลายในคลอโรฟอร์ม 0.5 มล. นำมา spot เป็นแถบยาวบน preparative TLC silica gel 60 จนหมด ทิ้งไว้ให้แห้ง โดยแผ่น TLC มีขนาด 20 x 20 ซม. หนา 2 มม. แล้วนำไปจุ่มในแท้งค์ที่อิ่มตัวไปด้วยไอของเฟสเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม 65 ส่วน, เมทานอล 25 ส่วน และ น้ำ 4 ส่วน เมื่อเฟสเคลื่อนที่เคลื่อนบนแผ่น TCL จนเกือบสุด(เหลือขอบประมาณ 0.5 มม.) นำออกมาแล้วทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ควัน จากนั้นนำมาอังกับไอที่อิ่มตัวของไอโอดีนเป็นเวลา 15 นาที จะเห็นแถบยาวสีน้ำตาลเกิดขึ้น(ใช้ดินสอขีดแถบสีน้ำตาลที่เกิดขึ้น)คำนวณค่า R_F โดยวัดระยะทางของแถบที่เกิดสีน้ำตาลแล้วหารด้วยระยะทางที่เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่บนแผ่น TLC ทิ้งไว้ 1 วันเพื่อให้ไอไอโอดีนระเหยออกจากแผ่น TLC เพื่อที่จะได้ปริมาณมากพอในการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไปจึงต้องเตรียมแผ่น TLC ทั้งหมด 5 แผ่น (ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนที่ใช้เท่ากับ 125 มก.) ให้หมดแล้วขูดแถบที่ขีดไว้บดให้ละเอียด(เกิดแถบสีน้ำตาลบนแผ่น TLC 6 แถบ) นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์โดย

แถบที่ 1 และ 2 จากด้านล่างนำมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอลด้วยอัตราส่วน 1ต่อ 3

แถบที่ 3 นำมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอล อัตราส่วน 1 ต่อ 2

แถบที่ 4 นำมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอล อัตราส่วน 1 ต่อ 1

แถบที่ 5 และ 6 นำมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

ซึ่งการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าวต้องทำซ้ำ 3-4 ครั้งหรือว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะหมดโดยนำมาวัดค่าการกระจายน้ำมันตามข้อ 3.2.3 นำสารกัดของแต่ละแถบมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator นำส่วนระเหยแห้งที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก

3.8.2 การบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ silica gel 60

นำผง silica gel 60 ประมาณ 60 กรัม มาบรรจุลงคอลัมน์โดยผสมตัวทำละลายอินทรีย์ตามอัตราส่วนแรกที่จะใช้ชะคอลัมน์ดังนี้

แถบที่ 1, 2 และ 3 ชะด้วยคลอโรฟอร์ม 80 % ในเมทานอลซึ่งผสมด้วย 0.5 % กรดอะซิติก แล้วชะต่อด้วยคลอโรฟอร์ม 60, 40 และ 20 % ตามลำดับ โดยมีปริมาณในแต่ละอัตราส่วนเท่ากับ 200 มล.

แถบที่ 4 ชะด้วยคลอโรฟอร์ม 100 % ในเมทานอลซึ่งผสมด้วย 0.5 % กรดอะซิติก แล้วชะต่อด้วยคลอโรฟอร์ม 80, 60 และ 40 % ตามลำดับ โดยมีปริมาณในแต่ละอัตราส่วนเท่ากับ 200 มล.

แถบที่ 5 ชะด้วยคลอโรฟอร์ม 100 % ในเมทานอลซึ่งผสมด้วย 0.5 % กรดอะซิติก แล้วชะต่อด้วยคลอโรฟอร์ม 90, 80, 60 และ 40 % ตามลำดับ โดยมีปริมาณในแต่ละอัตราส่วนเท่ากับ 200 มล.

แถบที่ 6 ชะด้วยคลอโรฟอร์ม 100 % ในเมทานอลซึ่งผสมด้วย 0.5 % กรดอะซิติก แล้วชะต่อด้วยคลอโรฟอร์ม 90, 80 และ 60 % ตามลำดับ โดยมีปริมาณในแต่ละอัตราส่วนเท่ากับ 200 มล.

โดยเก็บ fraction ละ ประมาณ 50 มล. ทิ้งไว้ 2-3 วันในตู้ควัน ปริมาณจะลดลง 2 ใน 3 แล้วนำแต่ละ fraction ที่ได้มา spot ลง analytic TLC spot ละประมาณ 2-3 ไมโครลิตร โดยทำตามข้อ 3.8.1 ซึ่งจะเห็นได้ว่าในแต่ละ fraction น่าจะเป็นสารชนิดเดียวกันหรือไม่ด้วยหลักการที่ว่าสารชนิดชนิดเดียวกันเคลื่อนที่บนเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่เดียวกันต้องมีค่า R_F และนำแต่ละ fraction มาวัดค่าการกระจายน้ำมันตามข้อ 3.2.3 นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่าง จำนวน fraction และ พื้นที่ของการกระจายน้ำมัน จากผลบน analytic TLC และ กราฟระหว่างค่าการกระจายน้ำมันและจำนวน fraction จะช่วยในการตัดสินใจว่าจะนำ fraction ใดรวมกันได้ เมื่อเทรวมกันแล้วนำไประเหยแห้งในเครื่อง evaporator นำส่วนระเหยแห้งไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ต่อไป

3.8.3 การตรวจวิเคราะห์น้ำตาลแรมโนสด้วยวิธีสแกนยูวี-วิสิเบลสเปกตรัม

เตรียมน้ำตาลที่ผลิตใน *Pseudomonas* sp. ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส แมนโนส และแรมโนส (Williams และ Wimpenny, 1978) ให้มีความเข้มข้น 5 µg/ml และนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บริสุทธิ์บางส่วนจากข้อ 3.6.2 ความเข้มข้น 5 มก. ต่อ มล.และ ตัวอย่างจากแถบที่ 5 ที่ได้จาก silica gel column (F5) จากข้อ3.8.2 ความเข้มข้น 5 มก. ต่อ มล. มาวิเคราะห์ปริมาณแรมโนสตามวิธีของ Dische และ Shettles ในปี 1948 จากนั้นสแกนหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 200 – 700 nm แล้วนำสเปกตรัมที่ได้มาเปรียบเทียบระหว่างน้ำตาลชนิดต่างๆที่ *Pseudomonas* sp. ผลิตได้

3.8.4 การทำบริสุทธิ์โดยวิธี HPLC

นำส่วนที่ทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์ silica gel แถบที่ 1 ละลายด้วย 10% อะซิโตไนไตรท์ 3 มล. แถบที่ 2 และ 3 ละลายใน 80% อะซิโตไนไตรท์ 3 มล. ส่วนแถบที่ 4, 5 และ 6 ละลายใน 100% อะซิโตไนไตรท์ 3 มล. นำตัวอย่างที่ได้วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC มีคอลัมน์เป็น Lichrocart C_{18} endcapped (reverse phase) ขนาด 250 x 4 มม. ชะด้วยลิเนียร์เกรเดียนท์ มีสารละลาย A (10% อะซิโตไนไตรท์ และ 0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซิติก) และ สารละลาย B (100% อะซิโตรไนไตรท์ และ 0.1% กรดไตรฟูลออโรอะซิติก) ด้วยอัตราการไหล 0.6 มล.ต่อนาที

ตัวอย่างจากแถบที่ 1 มีโปรแกมของลิเนียร์เกรเดียนท์ชะด้วยสารละลาย A เป็น 5 นาที เพิ่ม %สารละลาย Bเป็น 50% ในเวลา 10 นาที(5%B/min) เพิ่มเป็น 100% สารละลาย B ในเวลา 7 นาที (8%B/min)

ตัวอย่างจากแถบที่ 2 เริ่มต้นด้วยชะ 30%ของสารละลาย B เป็นเวลา 5 นาที เพิ่ม %สารละลาย Bเป็น 60% ในเวลา 15 นาที(2%B/min) เพิ่มเป็น 100% สารละลาย B ในเวลา 4 นาที (10%B/min)

ตัวอย่างจากแถบที่ 3 เริ่มต้นด้วยชะ 60%ของสารละลาย B เป็นเวลา 5 นาที เพิ่ม %สารละลาย Bเป็น 70% ในเวลา 10 นาที(0.5%B/min) เพิ่มเป็น 100% สารละลาย B ในเวลา 5 นาที (6%B/min)

ตัวอย่างจากแถบที่ 4 เริ่มต้นด้วยชะ 50%ของสารละลาย A เป็นเวลา 5 นาที เพิ่ม %สารละลาย Bเป็น 65% ในเวลา 15 นาที(1%B/min) เพิ่มเป็น 100% สารละลาย B ในเวลา 3.5 นาที (10%B/min)

ตัวอย่างจากแถบที่ 5 และ6 เริ่มต้นด้วยชะ 60%ของสารละลาย A เป็นเวลา 5 นาที เพิ่ม % สารละลาย Bเป็น 75% ในเวลา 20 นาที(1%B/min) เพิ่มเป็น 100% สารละลาย B ในเวลา 7 นาที (2%B/min)

ตรวจผลด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร เก็บแต่ peak ละไประเหยแห้งด้วยเครื่อง centrifuge evaporator เติม 1 โมล ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องผสมสารนาน 5 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการกระจายน้ำมันตามข้อ 3.2.3 นำตัวอย่างที่สกัดได้จากคอลัมน์ silica gel ไปฉีด HPLC อีกครั้งเพื่อเก็บ peak ที่มีค่าการกระจายน้ำมันมากไปวิเคราะห์ต่อไป

3.9 การวิเคราะห์โครงสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC โดยเลือกตัวอย่าง ณ RT ที่มีค่าการกระจายน้ำมันมาก (ประมาณ 121 ซม.) และมีปริมาณมากพอโดยเทียบจากขนาดและความสูงHPLC พีก จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC จนมีประมาณมากพอที่จะวิเคราะห์ด้วย LC-MS ซึ่งใช้ภาวะเดียวกับที่วิเคราะห์ด้วย HPLC (ทำการวิเคราะห์โดยนิรันดร์ รุ่งส่วาง จากมหาวิทยาลัยโอซากา) และ IR โดยนำตัวอย่างที่ได้จาก HPLC มาเติม nujol แล้วบดจากนั้นนำไปวิเคราะห์