บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

2.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น ALPHAPHOT-2/YS2 ของบริษัท Nikon ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องเก็บตัวอย่างแบบลำดับส่วน (fraction collector) รุ่น DC-180 ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องเก็บตัวอย่างแบบลำดับส่วน รุ่น LKB 2212 HELIRAC ของบริษัท LKB Bromma ประเทศสวีเดน
- เครื่องกำเนิดคลื่นอัลตราโซนิค (sonicator) ยี่ห้อ Delta รุ่น Ultrasonic Cleaner D200 ของบริษัท D.S.C. group ประเทศไต้หวัน
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.,Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น LC-TK ของบริษัท Infors ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaker bath) รุ่น WTR ของบริษัท Infors ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- เครื่องเขย่าผสม (vortex) รุ่น Vortex-Genie No.2 ของบริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบสัดส่วน (temperature gradient incubator) รุ่น TN-3F ของบริษัท Advantec Toyo Kaisha, Ltd. ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องชั่งแบบละเอียด (electronic balance) รุ่น ER-180A ของบริษัท A&D Company ประเทศญี่ปุ่น

- เครื่องชั่งแบบหยาบ รุ่น FX-3000 ของบริษัท A&D Company ประเทศญี่ปุ่น

- เครื่องทำความเย็น (circulation type handy cooler) รุ่น TRL-108 ของบริษัท Thomas Kagaku Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

- เครื่องปั่นเหวี่ยง (refrigerated centrifuge) รุ่น KR-20000T ของบริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น

- เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Z203 ของบริษัท Manufacturer B. Hermle AG ประเทศเยอรมัน

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

- เครื่องวัดจุดหลอมเหลว (melting point apparatus) ของบริษัท Fisher-Johns Scientific Co. ประเทศสหรัฐอเมริกา

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

- เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตรกราฟี (high performance liquid chromatography) รุ่น LC-6A ชุดควบคุมระบบรุ่น SLC-6A และเครื่องวิเคราะห์ผลรุ่น C-R4A Chromatopac ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น NK System Clean Bench ของบริษัท International Scientific Supply ประเทศไทย

- ถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น MD 300-5L L. E. Marubishi, Tokyo ประเทศญี่ปุ่น ตัวถังเป็นแก้ว มีใบพัด (impeller) แบบ 6-blade turbine ตัวควบคุมภาวะเป็น bioprocess controller รุ่น MDIAC-SS เครื่องอัดอากาศ (air compresser) ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น และเครื่องควบคุมระบบหล่อน้ำเย็น (circulation type handy cooler) รุ่น TRL-108 ของบริษัท Thomas Kagaku ประเทศญี่ปุ่น

- ถังหมักขนาด 30 ลิตร รุ่น MSJ-U2CL ของบริษัท B.E. Marubishi Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น ตัวถังเป็นสเตนเลส มีใบพัดแบบ 6-blade turbine ตัวควบคุมภาวะเป็น bioprocess controller รุ่น MDIAC-C1 เครื่องอัดอากาศ รุ่น AL 15 SA ของบริษัท Kobelco ประเทศญี่ปุ่น

- ปั๊ม (microperpex peristatic pump) รุ่น 2132 ของบริษัท LKB Bromma ประเทศสวีเดน

- ปั๊ม รุ่น Phamacia LKB-Pump P-1 ของบริษัท Phamacia Fine Chemical AB ประเทศสวีเดน

- แผ่นนับเม็ดเลือดแดง (haemacytometer) รุ่น Neubauer Bright Line ของบริษัท Bacco ประเทศเยอรมัน

- มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) รุ่น F-13 ของบริษัท HORIBA, Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

- มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น HI 8424 ของบริษัท Hanna Instruments ประเทศอิตาลี

- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (aquatherm water bath shaker) รุ่น G-86 ของบริษัท New Brunswich Scientific Co., Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
กรดจิบเบอเรลลิก (GA_3) มาตรฐาน	SIGMA ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดจิบเบอเรลลิก เกรดทางการค้า	ลัดดาไดนามิค ประเทศไทย นำเข้าจากประเทศจีน
กรดฟอสฟอริก	CARLO ERBA ประเทศอิตาลี
กรดอะซิติก	MERCK ประเทศเยอรมัน
กรดไฮโดรคลอริก	MERCK ประเทศเยอรมัน
คอปเปอร์ซัลเฟต	CARLO ERBA ประเทศอิตาลี
ซิงค์คลอไรด์	CARLO ERBA ประเทศอิตาลี
โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส	ประเทศไทย
โซเดียมอะซิเตท	FLUKA ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK ประเทศเยอรมัน
พาราเซตามอล (ชนิดฉีด)	T.P. Drug Laboratories ประเทศไทย
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส	MERCK ประเทศเยอรมัน
เมธานอล	Mallinckrodt ประเทศสหรัฐอเมริกา
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรท	FLUKA ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
เรซินแลกเปลี่ยนประจุลบ Amberlite IRA-400	SIGMA ประเทศสหรัฐอเมริกา

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
อลูมิเนียมออกไซด์	MERCK ประเทศเยอรมัน
3-อะเซตาไมโดฟีนอล	SIGMA ประเทศสหรัฐอเมริกา
เอทธิลอะซิเตต	CARLO ERBA ประเทศอิตาลี
แอมโมเนียมซัลเฟต	CARLO ERBA ประเทศอิตาลี
แอมโมเนียมไนเตรท	M&B ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อรา *Gibberella fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34

2.3 การเตรียมน้ำหมักของกรดจิบเบอเรลลิก

น้ำหมักที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้จากการหมักเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* ในถังหมักขนาด 30 ลิตร ตามวิธีของนายสันติ เหมศรี (2539) ซึ่งมีวิธีดังต่อไปนี้

2.3.1 การเตรียมเชื้อรา *Gibberella fujikuroi*

เขี่ยสายใยของเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* ที่เก็บรักษาไว้ในอาหารแข็งเอียงโพเตโตเดกซ์โทรสอาการ์เสริมแร่ธาตุ (potato dextrose agar, PDA) (ภาคผนวก ก-1) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ลงบนอาหารแข็งเอียงโพเตโตเดกซ์โทรสอาการ์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จนเชื้อเจริญดี

2.3.2 การเตรียมสปอร์

ถ่ายเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* ที่เลี้ยงจนเจริญดีแล้วตามข้อ 2.3.1 โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียงของน้ำต้มต้นข้าวโพด (ภาคผนวก ก-2) ในหลอดทดลอง ปิดปากหลอดด้วยสำลีเพื่อให้เชื้อมีอากาศเพียงพอในการเจริญเติบโต นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้หลอดไฟความเข้มแสง 9,840 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อสร้างสปอร์จะมีลักษณะเป็นสีส้ม จากนั้นถ่ายสปอร์ออกจากหลอดโดยล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ แล้วกรองผ่านผ้าขาวบางที่ซ้อนทับกันหนา 4-5 ชั้น นำสารแขวนลอยของสปอร์ที่ได้มานับจำนวนสปอร์ด้วยแผ่นนับเม็ดเลือดแดง เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ให้มีปริมาณเชื้อ 10^6 สปอร์ ต่อมิลลิลิตร

2.3.3 การเตรียมหัวเชื้อในระดับขวดเขย่า

นำสปอร์แขวนลอยจากข้อ 2.3.2 ที่มีปริมาณสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก-3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.3.4 การเตรียมหัวเชื้อในระดับถังหมัก 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้ในระดับขวดเขย่าตามวิธีข้อ 2.3.3 ปริมาตร 300 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงหัวเชื้อปริมาตร 2.7 ลิตร ที่เตรียมไว้ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมหัวเชื้อโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการในอากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3.5 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในถังหมักขนาด 30 ลิตร

นำหัวเชื้อที่เตรียมได้ในถังหมักขนาด 5 ลิตรตามวิธี 2.3.4 ปริมาตร 2 ลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตกรดจิบเบอเรลลิก (ภาคผนวก ก-4) ปริมาตร 18 ลิตร ที่เตรียมไว้ในถังหมักขนาด 30 ลิตร หมักเชื้อราเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวนเริ่มต้นเท่ากับ 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเริ่มต้นเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 24 ชั่วโมง ทำการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 10 % ตลอดการทดลอง โดยควบคุมอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศเป็นแบบอัตโนมัติ ใช้อะดีคานอล (adecanol) เป็นสารต่อต้านการเกิดฟอง เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน

2.4 การเก็บรักษาน้ำหมักกรดจิบเบอเรลลิก

นำผลิตผลที่ได้จากการหมักเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* ไปปั่นแยกเซลล์เชื้อราออกจากน้ำหมัก เก็บน้ำหมักไว้ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพให้คงที่

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก

วิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC) ใช้ภาวะในการวิเคราะห์ตามวิธีของนางสาวอรไท สุขเจริญ (2533) ดังต่อไปนี้

คอลัมน์	:	Spherisorb 5 C8 เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ยาว 250 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา	:	สารละลายเมธานอลในน้ำปราศจากไอออน (DDI) ที่ปรับค่าพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดฟอสฟอริก ในอัตราส่วน 35:65
อัตราการไหลของสารละลายตัวพา	:	1 มิลลิลิตรต่อนาที
ความดัน	:	180-220 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร
การตรวจวิเคราะห์	:	วัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 208 นาโนเมตร
ความไวของเครื่องตรวจวัด	:	0.08 AUFS (adsorbance unit full scale)
เวลาที่สารอยู่ในคอลัมน์	:	8-10 นาที
ปริมาตรสารตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์	:	10 ไมโครลิตร

ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกด้วย HPLC มีการเตรียมสารตัวอย่างของกรดจิบเบอเรลลิกด้วยวิธีแตกต่างกันออกไปตามลักษณะของสารตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ ดังนี้

2.5.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ครั้ง ที่พีเอช 7 และ 3

นำสารละลายตัวอย่างที่ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard) ได้แก่ พาราเซตามอล เข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร สกัดด้วยเอทธิลอะซิเตตปริมาตร 5 มิลลิลิตรในหลอดทดลองฝาเกลียว เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า

นาน 4 นาที ทิ้งให้แยกชั้น แล้วนำชั้นน้ำปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาปรับค่าพีเอชเป็น 3 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร สกัดด้วยเอทธิลอะซิเตตปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่านาน 4 นาที ทิ้งให้แยกชั้น นำสารละลายชั้นเอทธิลอะซิเตตมาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อกำจัดน้ำ นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 3 มิลลิลิตร มาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำมาละลายด้วยสารละลายตัวพา (สารละลายเมธานอลในน้ำปราศจากไอออนที่ปรับค่าพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดฟอสฟอริก อัตราส่วน 35 : 65) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตตที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกด้วยเครื่อง HPLC คำนวณหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข, รูปที่ ข-4)

2.5.2 การสกัดด้วยตัวทำละลายที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตรมาปรับพีเอชให้เท่ากับ 3 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เติม 3 - อะเซตาไมโดฟีนอล (3-Acetamidophenol) เข้มข้น 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในปริมาตร 40 ไมโครลิตร สกัดด้วยเอทธิลอะซิเตตปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงนาน 4 นาที ทิ้งให้สารแยกชั้น นำชั้นเอทธิลอะซิเตตมาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อกำจัดน้ำ นำสารละลายที่ได้ 3 มิลลิลิตร มาระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ แล้วละลายด้วยสารละลายตัวพาปริมาตร 3 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตต นำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกด้วยเครื่อง HPLC คำนวณหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข, รูปที่ ข-5)

2.5.3 การเตรียมสารตัวอย่างโดยไม่ผ่านการสกัด

ระเหยสารละลายตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร ให้แห้งภายใต้สุญญากาศ เติมสารละลายตัวพา 3 มิลลิลิตรและ 3-อะเซตาไมโดฟีนอล เข้มข้น 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 50 ไมโครลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตต แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข, รูปที่ ข-6)

2.5.4 การเตรียมตัวอย่างกรดจิบเบอเรลลิกที่เป็นของแข็ง

ละลายกรดจิบเบอเรลลิกตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอนในสารละลายตัวพาปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติม 3-อะเซตาไมโดฟีนอล เข้มข้น 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตต นำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข, รูปที่ ข-6)

2.6 การศึกษาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิก

เป็นการหาค่าจลนพลศาสตร์ของการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกเมื่อละลายอยู่ในตัวทำละลายต่าง ๆ ที่อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกัน เพื่อใช้เป็นข้อมูลกำหนดภาวะในการทดลองขั้นต่อ ๆ ไป มีการศึกษาในภาวะดังต่อไปนี้

2.6.1 การสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมักของเชื้อรา *G. fujikuroi*

ปิเปตน้ำหมักที่ทราบปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกแน่นอนจากการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 2.5.1 ใส่หลอดฝาเกลียวหลอดละ 3 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น แล้วนำไปควบคุมอุณหภูมิในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 20, 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลาในการทดลองต่าง ๆ กัน วิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่เหลืออยู่ในน้ำหมักด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีข้อ 2.5.1 คำนวณค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมัก (rate constant) และค่าครึ่งชีวิต (half life) ของกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมักที่อุณหภูมิต่าง ๆ

2.6.2 การสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชแตกต่างกัน

เตรียมสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ได้แก่ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.3, 7.0 และ 8.0 (ภาคผนวก ค-1) และสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 (ภาคผนวก ค-2) ปิเปตสารละลายใส่หลอดทดลองฝาเกลียวหลอดละ 3 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น นำไปควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เก็บตัวอย่างเมื่อทิ้งไว้ที่เวลาต่าง ๆ กัน นำไปหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกด้วย HPLC ตามวิธีในข้อ 2.5.2 คำนวณค่าคงที่ของการเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกันและค่าครึ่งชีวิตของกรดจิบเบอเรลลิก

2.6.3 การสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายที่มีความเป็นเบสสูง

ละลายกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.01 โมลาร์ที่เย็นจัด ปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ใส่หลอดฝาเกลียวหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 15 นาที นำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกด้วย HPLC ตามวิธีข้อ 2.5.2 คำนวณหาค่าทางจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยา เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.6.2

2.6.4 การสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายตัวชะ

เป็นการทดลองเพื่อศึกษาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายเมธานอลในน้ำ ที่มีการเติมกรดเข้มข้น เพื่อเป็นข้อมูลในการเลือกสารละลายที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน มีการทดลองในสารละลายดังนี้

2.6.4.1 การสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายเมธานอลในน้ำที่เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น

ละลายกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายเมธานอลในน้ำ เข้มข้น 93 % โดยปริมาตร ที่เติมกรดไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักกรดต่อปริมาตรสารละลาย (ภาคผนวก ค-3) ปิเปตสารละลายปริมาตร 3 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองฝาเกลียว นำไปควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกด้วย HPLC ตามวิธีข้อ 2.5.3 หาค่าคงที่ของปฏิกิริยาและคำนวณหาค่าครึ่งชีวิต

2.6.4.2 การสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายเมธานอลในน้ำ ที่เติมกรดอะซิติกเพื่อปรับพีเอชเป็น 3

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.6.4.1 แต่เปลี่ยนสารละลายที่ทดลอง เป็นสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลาย 93 % เมธานอลในน้ำ ที่เพื่อปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก (ภาคผนวก ค-4) และเก็บตัวอย่างทุก 7 วัน

2.7 การเตรียมเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

เตรียมเรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบ Amberlite IRA-400 ให้มีเคาน์เตอร์ไอออน (counter ion) อยู่ในรูปของ คลอไรด์ไอออน (Cl^-) โดยบรรจุเรซินปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์แก้ว ผ่านกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักปริมาตร 500 มิลลิลิตรเข้าคอลัมน์แล้วล้างด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนจนน้ำล้างเรซินมีสภาพเป็นกลาง เก็บเรซินในน้ำที่ปราศจากไอออนเพื่อนำไปใช้ในงานวิจัยต่อไป

2.8 การศึกษาสมบัติของเรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบ Amberlite IRA-400

2.8.1 ความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนของเรซิน

บรรจุเรซินที่ผ่านการล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 15 มิลลิลิตรในคอลัมน์แก้ว ผ่านสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เข้าคอลัมน์ อัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อนาที ล้างคลอไรด์ไอออนที่มากเกินพอด้วยสารละลายของน้ำปราศจากไอออนกับไอโซโพรพานอล อัตราส่วน 3 ต่อ 1 โดยปริมาตร ใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรตในการตรวจสอบคลอไรด์ไอออน ผ่านสารละลายโซเดียมไนเตรต 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 500 มิลลิลิตร เข้าคอลัมน์ เก็บสารละลายที่ผ่านออกจากคอลัมน์ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร นำสารที่เก็บได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ไปไตเตรตกับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต เข้มข้น 0.1 นอร์มอล เพื่อหาปริมาณคลอไรด์ไอออน นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนของเรซิน (Total capacity) จากสมการ

$$\text{Total capacity by volume} = \frac{(500/50) \times \text{ปริมาตร } AgNO_3 \times \text{ความเข้มข้น } AgNO_3}{\text{ปริมาตรเรซิน}} \quad (2\text{-}1)$$

ค่าความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนของเรซิน มีหน่วยเป็นมิลลิอิควิวาเลนท์ต่อมิลลิลิตร (meq/ml) ใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการกำหนดปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ควรผ่านเข้าคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนในการทดลองขั้นต่อไป

2.8.2 เวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของเรซินในการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิก

กรองเรซินที่แช่อยู่ในน้ำปราศจากไอออนปริมาตรตามกำหนดผ่านกระดาษกรอง แล้วถ่ายเรซินลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ เทสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงในขวดบรรจุเรซิน เขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เริ่มจับเวลาทันที เก็บตัวอย่างทุก 5 นาที โดยกรองเรซินออก นำสารละลายที่ผ่านการกรองไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกด้วย HPLC ตามวิธีข้อ 2.5.2 ในการทดลองนี้มีการแปรปริมาตรเรซินและสารละลายกรดจิบเบอเรลลิก ดังต่อไปนี้

- เรซิน 1 มิลลิลิตร : สารละลายกรดจิบเบอเรลลิก 25 มิลลิลิตร
- เรซิน 1 มิลลิลิตร : สารละลายกรดจิบเบอเรลลิก 50 มิลลิลิตร
- เรซิน 2 มิลลิลิตร : สารละลายกรดจิบเบอเรลลิก 50 มิลลิลิตร

เวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของเรซินจะถูกใช้เป็นข้อมูลในการหาอัตราการไหลเบื้องต้น สำหรับการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนต่อไป

2.9 การหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกกรดจิบเบอเรลลิกจากน้ำหมักด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน

2.9.1 คอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน

เป็นคอลัมน์แก้ว 2 ชั้น คอลัมน์ชั้นในมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.8 เซนติเมตร บรรจุเรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบ Amberlite IRA-400 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีปริมาตรว่างระหว่างเรซิน (void volumn) 3.6 มิลลิลิตร ระหว่างคอลัมน์ชั้นในกับชั้นนอก มีระบบน้ำไหลเวียนเข้าและออกจากคอลัมน์เพื่อควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้คงที่ด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

ปริมาตรว่างระหว่างเรซิน (void volume) ได้จากการวัดปริมาตรน้ำที่อยู่ระหว่างอนุภาคของเรซิน โดยบรรจุเรซินที่แช่อยู่ในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เข้าคอลัมน์ แล้วปล่อยให้น้ำไหลออกจากคอลัมน์จนคอลัมน์แห้ง ปริมาตรน้ำทั้งหมดที่วัดได้ก็คือปริมาตรว่างระหว่างเรซินที่ใช้ในงานวิจัยนี้

2.9.2 ขั้นตอนการดูดซับ

ทดลองแปรปัจจัย ได้แก่ ลักษณะของสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์ และอัตราการไหลของสารละลาย เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกของคอลัมน์

2.9.2.1 สารละลายกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านเข้าคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน

2.9.2.1.1 น้ำหมักของกรดจิบเบอเรลลิก พีเอชเท่ากับ 3

กรองน้ำหมักผ่านกระดาษกรอง GF/C (very fine glass microfibre filter) แล้วผ่านเข้าคอลัมน์บรรจุเรซิน ด้วยอัตราการไหลที่เหมาะสมตามการทดลองที่ 2.8.2 ควบคุมอุณหภูมิโดยพิจารณาจากการทดลองที่ 2.6.1 เก็บสารที่ไหลออกจากคอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างแบบลำดับส่วน นำสารที่เก็บได้แต่ละลำดับส่วนไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกด้วย HPLC ตามวิธีข้อ 2.5.2 คำนวณหาอัตราส่วนของปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ไหลออกจากคอลัมน์ต่อกรดจิบเบอเรลลิกเริ่มต้น เปอร์เซ็นต์การดูดซับ นำข้อมูลมาสร้าง breakthrough curve และกราฟแสดงการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิก

2.9.2.1.2 น้ำหมักของกรดจิบเบอเรลลิกที่ปรับค่าพีเอชเป็น 7

ปรับค่าพีเอชของน้ำหมักให้เป็น 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 โมลาร์ แยกตะกอนออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง แล้วผ่านสารเข้าคอลัมน์ ทำการทดลองและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 2.9.2.1.1

2.9.2.1.3 น้ำหมักที่สกัดแยกสิ่งเจือปนบางส่วนด้วยเอทธิลอะซิเตต

สกัดน้ำหมักที่ปรับค่าพีเอชเป็น 7 ด้วยเอทธิลอะซิเตต อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ในกรวยแยก 2 ครั้ง ทิ้งให้แยกชั้น นำชั้นน้ำหมักมาผ่านเข้าคอลัมน์ ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.9.2.1.1

2.9.2.1.4 สารละลายจากการสกัดน้ำหมักด้วยเอทธิลอะซิเตต แล้วตามด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7

ปรับค่าพีเอชของน้ำหมักเป็น 3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แล้วสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต 2 ครั้ง อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ระเหย

ชั้นเอทธิลอะซิเตตภายใต้สุญญากาศให้เหลือปริมาตร 1 ใน 4 สกัดด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 อัตราส่วนของเอทธิลอะซิเตตต่อบัฟเฟอร์เป็น 1 ต่อ 2 นำสารละลายชั้นบัฟเฟอร์ผ่านเข้าคอลัมน์ ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.9.2.1.1

2.9.2.1.5 สารละลายจากการสกัดน้ำหมักด้วยเอทธิลอะซิเตต แล้วตามด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.9.2.1.4 โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็น 0.1 โมลาร์

2.9.2.1.6 สารละลายกรดจิบเบอเรลลิกเกรดทางการค้า จากลัดดาไดนามิค ละลายกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำปราศจากไอออนแล้วผ่านเข้าคอลัมน์ ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.9.2..1.1

2.9.2.2 อัตราการไหลของสารละลาย

2.9.2.2.1 การหาเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกของเรซินจากสารละลายที่เหมาะสม

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.8.2 โดยใช้เรซินปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2.9.2.1 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างที่เวลา 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที

เวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวจากการทดลองนี้ จะใช้เป็นเกณฑ์ในการเลือกอัตราการไหลที่จะทำการทดลองในขั้นต่อไป

2.9.2.2.2 อัตราการไหลที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกของคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน

เตรียมสารละลายกรดจิบเบอเรลลิก ที่ให้ผลการดูดซับที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2.9.2.1 ผ่านสารละลายเข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหลต่าง ๆ กันในหน่วย space velocity (มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน)

$$\text{space velocity} = \frac{\text{อัตราการไหล (มล./ชม.)}}{\text{ปริมาตรว่างระหว่างเรซิน (มล.)}} \quad (2\text{-}2)$$

อัตราการไหลที่ทดลอง คือ 10, 6.67, 5, 3.33, 2.5, 1.67 และ 0.83 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อมิลลิลิตรของปริมาตรว่างระหว่างเรซิน เก็บสารที่ผ่านออกจากคอลัมน์เป็นส่วน ๆ นำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกด้วย HPLC ตามวิธีข้อ 2.5.2 คำนวณหาอัตราส่วนของปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผ่านออกจากคอลัมน์ต่อกรดจิบเบอเรลลิกเริ่มต้น พลอตกราฟ breakthrough curve และกราฟแสดงการดูดซับของกรดจิบเบอเรลลิก เพื่อเปรียบเทียบหาอัตราการไหลที่เหมาะสม

2.9.3 ขั้นตอนการการชะ

ทดลองแปรปัจจัย ได้แก่ ชนิดของสารละลายตัวชะและอัตราการไหลของสารละลายตัวชะเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการชะกรดจิบเบอเรลลิกที่ถูกดูดซับออกจากคอลัมน์

2.9.3.1 เวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของการชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากเรซิน

เตรียมเรซินที่ดูดซับกรดจิบเบอเรลลิก โดยผสมสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2.9.2.1 กับเรซิน ในอัตราส่วน 4 ต่อ 1 โดยปริมาตร เขย่าด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองแยกเรซินแล้วล้างเรซินด้วยเมธานอลเพื่อกำจัดกรดจิบเบอเรลลิกที่ไม่ถูกดูดซับ กรองแยกเมธานอลออก ใส่เรซินในขวดรูปชมพู่ นำไปควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เติมสารละลายตัวชะ ได้แก่ 93 % เมธานอลในน้ำที่ปรับพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก ในอัตราส่วนเรซินต่อตัวชะเท่ากับ 1 ต่อ 5 โดยปริมาตร เขย่าที่ 300 รอบต่อนาที เริ่มจับเวลาทันที เก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ กัน โดยกรองแยกเรซินออก นำสารละลายไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกด้วย HPLC ตามวิธีข้อ 2.5.3 พลอตกราฟระหว่างปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้กับระยะเวลาในการชะ เพื่อหาเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัว เวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของการชะนี้จะใช้กำหนดอัตราการไหลเบื้องต้นสำหรับการทดลองในขั้นตอนการชะต่อ ๆ ไป

2.9.3.2 ชนิดของสารละลายตัวชะ

เตรียมคอลัมน์ที่มีการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิก โดยผ่านสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2.9.2.1 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เข้าคอลัมน์ อัตราการ

ไหลพิจารณาจากการทดลองข้อ 2.9.2.2.2 ชะคอลัมน์ด้วยเมธานอลเพื่อกำจัดกรดจิบเบอเรลลิกที่ไม่ถูกดูดซับ แล้วชะคอลัมน์ด้วยสารละลายตัวชะชนิดต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วยสารละลายเมธานอลในน้ำที่ปรับค่าพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก (ภาคผนวก ค-4) เก็บสารละลายที่ผ่านออกจากคอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างแบบลำดับส่วน วิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในลำดับส่วนต่าง ๆ ด้วย HPLC ตามวิธีข้อ 2.5.3 คำนวณหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ต่อปริมาตรสารละลายตัวชะ นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อหาสารละลายตัวชะที่เหมาะสม

สารละลายตัวชะที่ทำการทดลอง ได้แก่

- สารละลาย 70 % เมธานอลในน้ำ ปรับพีเอช เป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก
- สารละลาย 80 % เมธานอลในน้ำ ปรับพีเอช เป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก
- สารละลาย 93 % เมธานอลในน้ำ ปรับพีเอช เป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก
- เมธานอล 100 % ปรับพีเอช เป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก

2.9.3.3 อัตราการไหลของสารละลายตัวชะ

ผ่านสารละลายตัวชะที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.9.3.2 เข้าคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนที่มีการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกและกำจัดกรดจิบเบอเรลลิกที่ไม่ถูกดูดซับออกด้วยเมธานอลแล้ว แปรอัตราการไหลของสารละลายตัวชะ ในหน่วย space velocity ได้แก่ 3.33, 1.67, 1.33, 0.83 และ 0.28 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ต่อมิลลิลิตรของช่องว่างระหว่างเรซิน เก็บสารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์เป็นลำดับส่วน วิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในแต่ละส่วนด้วย HPLC ตามวิธีข้อ 2.5.3 จนไม่พบกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายตัวชะ หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ชะได้ต่อปริมาตรสารละลายตัวชะ เพื่อใช้เปรียบเทียบหาอัตราการไหลที่เหมาะสม

2.10 การหาภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก

ตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิกโดยใช้เอทธิลอะซิเตตเป็นตัวทำละลาย แปรอุณหภูมิในการตกผลึกและวิธีในการตกผลึก เพื่อหาภาวะที่ให้ผลึกที่มีความบริสุทธิ์และปริมาณการตกผลึกสูง

2.10.1 ความสามารถในการละลายของกรดจิบเบอเรลลิกในเอทธิลอะซิเตต

ชั่งกรดจิบเบอเรลลิกมาตรฐานจากบริษัท SIGMA น้ำหนัก 0.01 กรัมใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว ปิเปตเอทธิลอะซิเตตปริมาตรน้อย ๆ เติมลงในหลอด นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลา สังเกตการละลายของสาร ถ้ากรดจิบเบอเรลลิกยังละลายไม่หมด ให้เติมเอทธิลอะซิเตตที่ทราบปริมาตรแน่นอนที่ละน้อยแล้วเขย่า จนกรดจิบเบอเรลลิกละลายหมด บันทึกปริมาตรเอทธิลอะซิเตตที่ใช้ละลายกรดจิบเบอเรลลิก คำนวณหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ละลายได้สูงสุดในเอทธิลอะซิเตต ที่อุณหภูมิต่างๆ แล้วนำมาพลอตกราฟกับอุณหภูมิ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการละลายของกรดจิบเบอเรลลิกในเอทธิลอะซิเตตกับอุณหภูมิของสารละลาย

2.10.2 อุณหภูมิที่ตกผลึก

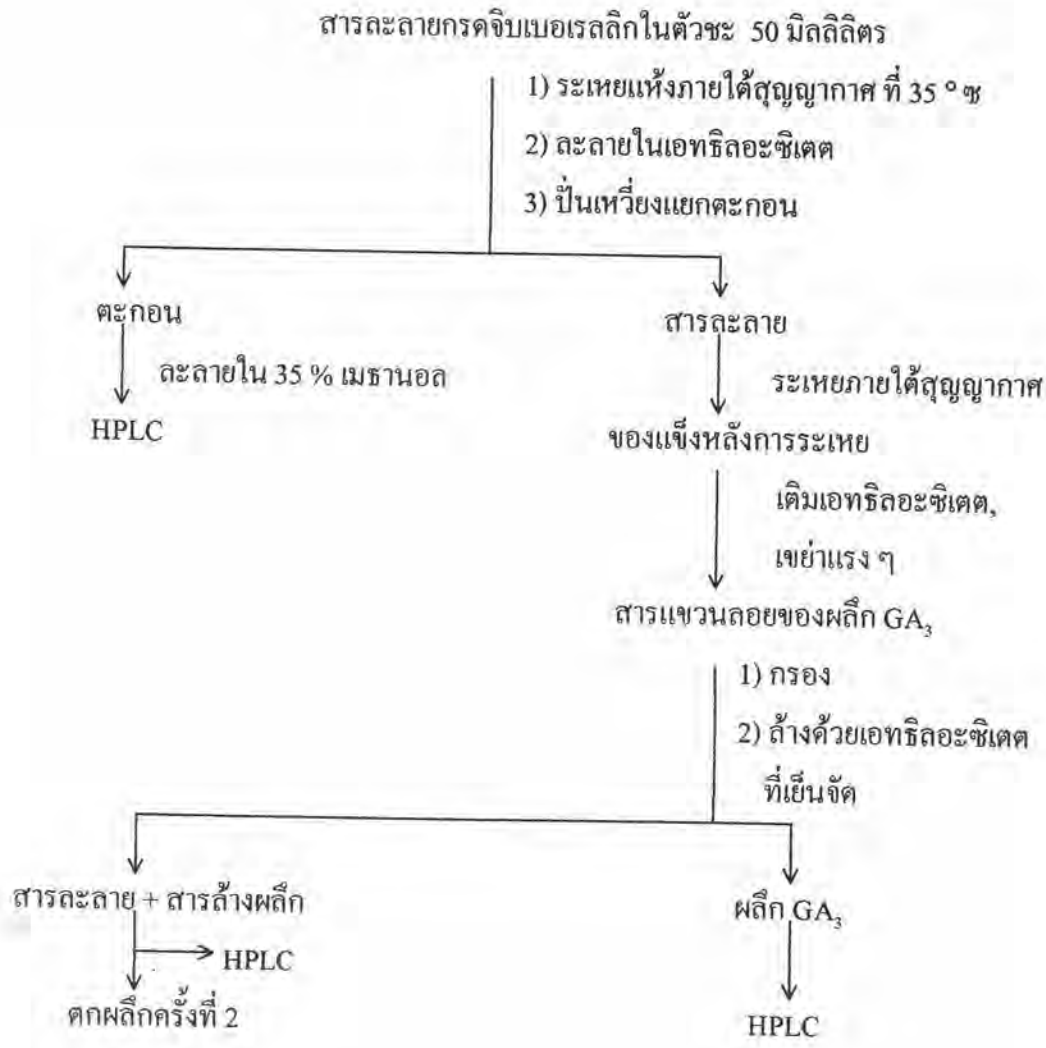
เตรียมสารละลายอิ่มตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในเอทธิลอะซิเตต ที่จุดเดือดของสารละลาย ปิเปตสารละลายที่ได้ ใส่หลอดทดลองรูปตัวแอล (L type culture tube) หลอดละ 20 มิลลิลิตร นำไปควบคุมอุณหภูมิด้วยเครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิแบบสัดส่วน ที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยเริ่มจากอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แล้วค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลงจนถึง 4 องศาเซลเซียส สังเกตการตกผลึก เมื่ออุณหภูมิลดลงทุก 10 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างสารที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยกรองแยกผลึกและสารละลายออกจากกัน นำผลึกไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ตามวิธีข้อ 2.5.4 เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ วิเคราะห์สารละลายตามวิธีข้อ 2.5.3 คำนวณหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึก เปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของผลึกและปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึกที่อุณหภูมิต่าง ๆ เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกผลึก

2.10.3 วิธีตกผลึก

2.10.3.1 การระเหยแห้งแล้วเติมเอทธิลอะซิเตตเพื่อตกผลึก

นำสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกในตัวชะ ที่ได้จากการชะคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาระเหยจนแห้งภายใต้สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เติมเอทธิลอะซิเตต 50 มิลลิลิตร ในสารหลังการระเหย ทำสารให้ละลายด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นอัลตราโซนิค ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนและสารละลายออกจากกัน ละลายตะกอนด้วยสารละลายตัวพา วิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่อยู่ในตะกอนด้วย HPLC ตามวิธีข้อ 2.5.4 นำสารละลายไประเหยภายใต้สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจนแห้ง เติมเอทธิลอะซิเตต

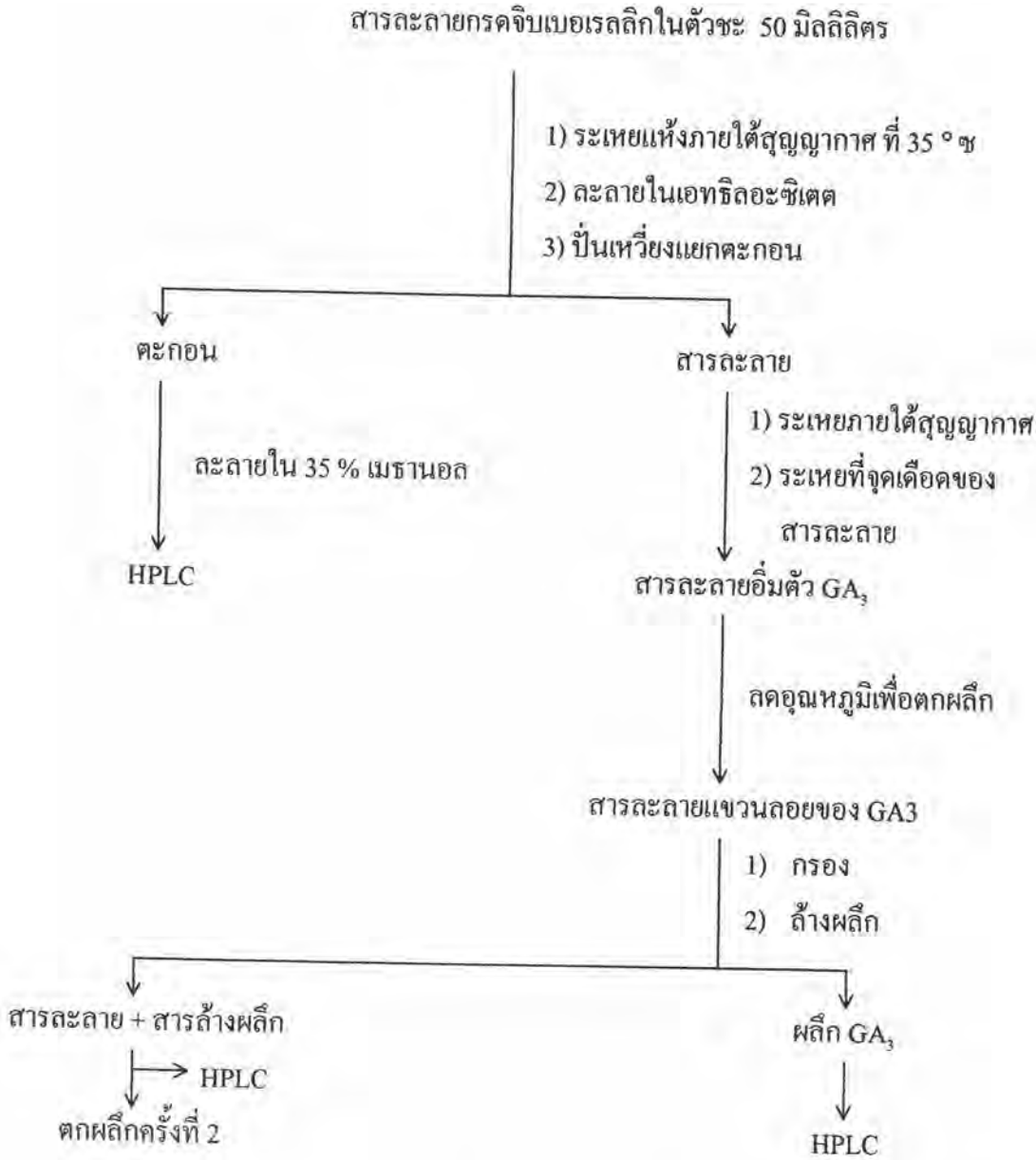
ปริมาตรน้อย ๆ ลงในสารหลังการระเหย เขย่าด้วยเครื่องเขย่าผสมอย่างแรงจนสังเกตเห็นผลึกของแข็งแขวนลอยอยู่ในสารละลาย กรองแยกผลึกออกจากสารละลาย ล้างด้วยเอทธิลอะซิเตตที่เย็นจัด นำผลึกมาวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกตามวิธีข้อ 2.5.4 และคำนวณหาความบริสุทธิ์ของผลึก วิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในสารผสมของสารละลายหลังกรองผลึกกับสารจากการล้างผลึก ตามวิธีข้อ 2.5.3 แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึก ระเหยสารละลายผสมจนแห้ง เติมเอทธิลอะซิเตตเพื่อตกผลึกเป็นครั้งที่ 2 กรองแยกผลึกและวิเคราะห์หาค่าต่าง ๆ ตามการทดลองข้างต้น ขั้นตอนการตกผลึกแสดงดังรูปที่ 2-1



รูปที่ 2-1 การตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิกจากสารละลายที่ชะจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนด้วยวิธีระเหยตัวชะให้แห้งแล้วเติมเอทธิลอะซิเตตเพื่อตกผลึก

2.10.3.2 การเตรียมสารละลายอิ่มตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในเอทธิลอะซิเตต ที่จุดเดือดของสารละลายและลดอุณหภูมิเพื่อตกผลึก

ระเหยสารละลายของกรดจิบเบอเรลลิกในตัวชะ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ภายใต้สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เติมเอทธิลอะซิเตต 100 มิลลิลิตร ในสารหลังการระเหย ทำสารให้ละลายด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นอัลตราโซนิค ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ไม่ละลายออก นำมาวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.10.3.1 ระเหยสารละลายหลังแยกตะกอน ภายใต้สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนปริมาตรลดลงเป็นครึ่งหนึ่งของปริมาตรเริ่มต้น ถ่ายสารละลายใส่หลอดทดลอง แล้วระเหยเอทธิลอะซิเตตออกที่จุดเดือดของสารละลาย จนสารละลายอิ่มตัว นำไปควบคุมอุณหภูมิด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ โดยลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ จนถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการตกผลึก (จากการทดลองข้อ 2.10.2) กรองแยกผลึกและล้างด้วยเอทธิลอะซิเตตที่เย็นจัด ผสมสารจากการล้างผลึกกับสารละลายหลังกรองแยกผลึก วิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกจากผลึกและสารละลายผสมและคำนวณค่าต่าง ๆ เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.10.3.1 ตกผลึกครั้งที่ 2 โดยระเหยสารละลายผสมภายใต้สุญญากาศให้ปริมาตรลดลงครึ่งหนึ่งและระเหยต่อที่อุณหภูมิจุดเดือดของสารละลาย จนสารละลายอิ่มตัว ลดอุณหภูมิให้เกิดการตกผลึก กรองล้างผลึกและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับการตกผลึกครั้งแรก ขั้นตอนการตกผลึกแสดงดังรูปที่ 2-2



รูปที่ 2-2 การตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิกจากสารละลายที่ชะจากคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน ด้วยการเตรียมสารละลายอิ่มตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในเอทธิลอะซิเตตที่จุดเดือดของสารละลายและลดอุณหภูมิเพื่อตกผลึก

2.11 การหาสมบัติของกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึกได้

ทดลองหาสมบัติของผลึกกรดจิบเบอเรลลิกที่เตรียมได้พร้อมทั้งพิสูจน์เอกลักษณ์

2.11.1 สมบัติทางกายภาพ

สังเกตสี ลักษณะผลึก และรูปร่างผลึกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 200 เท่า

2.11.2 สมบัติทางเคมี

2.11.2.1 จุดหลอมเหลว

หาจุดหลอมแหลวของผลึกกรดจิบเบอเรลลิกที่เตรียมได้ ด้วยเครื่องวิเคราะห์จุดหลอมเหลว (melting point apparatus) เปรียบเทียบกับจุดหลอมเหลวของผลึกกรดจิบเบอเรลลิกมาตรฐาน

2.11.2.2 ลักษณะโครมาโตรแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

นำสารละลายของกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึกได้ ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ตามวิธีข้อ 2.5.4 เปรียบเทียบโครมาโตรแกรมที่ได้กับโครมาโตรแกรมของกรดจิบเบอเรลลิกมาตรฐาน

2.11.2.3 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนท์สเปกตรัม

นำผลึกกรดจิบเบอเรลลิกที่เตรียมได้ และผลึกกรดจิบเบอเรลลิกมาตรฐานไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนท์สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (NMR) เปรียบเทียบลักษณะสเปกตรัมของผลึกกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึกได้ กับสเปกตรัมของผลึกกรดจิบเบอเรลลิกมาตรฐาน