

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกกรดจิบเบอเรลลิกจากน้ำหมักและทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาค ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาค หรือเรซินที่ใช้เป็นแอนไอออนเรซินชนิด strong มีชื่อทางการค้า Quaron AU-808 ทำการศึกษา ทั้งในระบบแบทช์และระบบคอลัมน์ เพื่อให้มีข้อมูลเบื้องต้นเพียงพอในการนำไปใช้ในทางปฏิบัติจริง

4.1 ขั้นตอนการแยกกรดจิบเบอเรลลิกด้วยแอนไอออนเรซิน

4.1.1 ระบบแบทช์

ระบบแบทช์เป็นระบบที่ใช้ศึกษาในเบื้องต้นของปรากฏการณ์การดูดซับและการชะล้างที่ส่งผลกระทบต่อขั้นตอนทั้งสอง และการหาค่าคงที่ selectivity coefficient ของกรดจิบเบอเรลลิก ซึ่งถ้าสิ่งปนเปื้อนในน้ำหมักมีค่า selectivity coefficient ใกล้เคียง จะทำให้ประสิทธิภาพการแยกต่ำลง จากงานวิจัยนี้ได้หา selectivity coefficient ของกรดจิบเบอเรลลิก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้ค่าประมาณ 0.73

สำหรับการศึกษา pH เริ่มต้นที่เหมาะสมของน้ำหมักในขั้นตอนการดูดซับ ซึ่งต้องปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้สูงขึ้นเพื่อให้กรดจิบเบอเรลลิกอยู่ในฟอร์มที่เหมาะสมที่สามารถเกาะกับเรซินได้ จึงศึกษาหาค่า pH เริ่มต้นของน้ำหมักกรดจิบเบอเรลลิกโดยกำหนดจากค่า pH ที่สูงที่สุดของสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกที่ยังคงให้ความเสถียรแก่กรดจิบเบอเรลลิก เนื่องจากในสารละลายที่มีค่า pH สูงมาก ๆ จะมีความเป็นด่างสูง กรดจิบเบอเรลลิกอาจถูกทำลายได้ จากผลการทดลองพบว่าค่า pH ของสารละลายที่สูงที่สุดที่กรดจิบเบอเรลลิกไม่ถูกทำลายไปคือ 9.0 และที่ pH สูงกว่า 9.0 กรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายถูกทำลายมากขึ้นตามค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงขึ้น และถูกทำลายหมดในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 12.0 ในเวลาเพียง 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ

25^oซ แต่อย่างไรก็ตามในขณะที่ทำการทดลองในขั้นตอนการดูดซับ กรดจิบเบอเรลลิกจะเข้าแทนที่ OH⁻ (ซึ่งเป็น counter ion) บนเรซิน มีผลทำให้เพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายสูงขึ้นได้อีก ดังนั้นจึงกำหนดค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมของน้ำหมักกรดจิบเบอเรลลิกในขั้นตอนการดูดซับเท่ากับ 8.0

สำหรับปัจจัยของตัวชะ จากการทดลองเมื่อใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์เป็นสารละลายตัวชะ พบว่าสารละลายนี้ไม่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนการชะ เพราะมีผลต่อความเสถียรของกรดจิบเบอเรลลิก เนื่องจากเป็นสารละลายที่มีความเป็นด่างสูง จากการทดลองเมื่อให้กรดจิบเบอเรลลิกอยู่ในสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์เพียง 20 นาทีพบว่ากรดจิบเบอเรลลิกถูกทำลายได้มากกว่า 60% ของปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกตั้งต้น และถูกทำลายเกือบถึง 90% ในเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25^oซ จึงพิจารณาหาตัวชะใหม่ Merck & Co.(1960) ได้รายงานการใช้เรซินแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดแอนไอออน เช่น Amberlite IRA-401 Duolite A-41 Dowex1-X2 ในการแยกกรดจิบเบอเรลลิก มีประสิทธิภาพในการแยกกรดจิบเบอเรลลิกได้ 80-90% และทำการชะกรดจิบเบอเรลลิกจากคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเช่น 5-7% กรดไฮโดรคลอริกในเมทานอล 5-7% กรดซัลฟูริกในเมทานอล เป็นต้น และจากรายงานได้อ้างไว้ว่าสารละลาย 93% เมทานอลที่มี 7%(w/v) กรดไฮโดรคลอริก เป็นสารละลายตัวชะที่สามารถชะกรดจิบเบอเรลลิกได้ถึง 94-98% (%yield) จากการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่าสารละลาย 91% เมทานอลที่มี 9%(w/v) กรดไฮโดรคลอริกเป็นสารละลายตัวชะมีประสิทธิภาพการชะได้สูงสุดให้เปอร์เซ็นต์การชะกรดจิบเบอเรลลิก 45.62 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณการดูดซับ

การศึกษาปัจจัยอุณหภูมิของระบบในงานวิจัยนี้ ทำการแปรอุณหภูมิของระบบเป็น 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่าในขั้นตอนการดูดซับ ระบบที่ควบคุมอุณหภูมิของระบบเท่ากับ 35 องศาเซลเซียสมีค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซับสูงสุดเท่ากับ 70.39 เปอร์เซ็นต์สูงกว่าระบบที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 25 30 และ 40 องศาเซลเซียส และในขั้นตอนการชะพบว่าระบบที่ควบคุมอุณหภูมิของระบบเท่ากับ 25 องศาเซลเซียสมีค่าเปอร์เซ็นต์การชะกรดจิบเบอเรลลิกสูงสุดเท่ากับ 45.62 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาถึงค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตกลับคืน พบว่าเมื่อแปรอุณหภูมิของระบบสูงขึ้น ค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตกลับคืนมีแนวโน้มต่ำลง ซึ่งการทดลองในงานวิจัยนี้ ระบบที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25^oซ ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตกลับคืนสูงสุดเท่ากับ 24.65%

4.1.2 ระบบคอลัมน์

ระบบคอลัมน์ที่ศึกษาใช้ระบบคอลัมน์เดี่ยว เป็นระบบที่มีปริมาณเรซินอยู่จำกัด กรดจิบเบอเรลลิกจะถูกดูดซับที่เรซินภายใต้ภาวะที่กำหนด ในขณะที่เดียวกันถึงปนเปื้อนก็ถูกขจัดออก กรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมักที่มีความเข้มข้นมากเกินไปจะถูกดูดซับที่แอนไอออนเรซิน ก่อนที่จะรั่วออกจากคอลัมน์ ตรงจุดนี้เรียก breakthrough curve เป็นการวัดปริมาณความจุสูงสุดของคอลัมน์ ซึ่งจากงานวิจัยนี้ได้ค่าความจุสูงสุดเท่ากับ 66.26 เปอร์เซ็นต์ และผลิตผลกลับคืน 33.13 เปอร์เซ็นต์ เป็นค่าสูงสุดภายใต้ภาวะที่กำหนด คือปริมาณเรซินที่บรรจุในคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.47 เซนติเมตร (คิดเป็นปริมาตรของ bed volume (BV) เท่ากับ 23.25 ลบ.ซม.) และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก 88.114 มิลลิกรัม (น้ำหมักมีความเข้มข้นกรดจิบเบอเรลลิกเริ่มต้นเท่ากับ 440.571 มก./ล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 200 มล.) ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส สำหรับภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการจะทำการพิจารณาปัจจัยที่มีอิทธิพลได้แก่ อุณหภูมิของระบบ อัตราการไหล เพื่อช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพของ กระบวนการให้ดียิ่งขึ้น

4.1.2.1 ปัจจัยของอุณหภูมิของระบบ

การศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิของระบบ เมื่อทำการแปรอุณหภูมิในขั้นตอนการดูดซับและการชะเป็น 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่าในขั้นตอนการดูดซับคอลัมน์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซับสูงสุดเท่ากับ 87.22 เปอร์เซ็นต์ สำหรับขั้นตอนการชะพบว่าสามารถชะกรดจิบเบอเรลลิกได้มากที่สุดเมื่อควบคุมอุณหภูมิกอลัมน์ไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส ชะกรดจิบเบอเรลลิกได้ 33.13 เปอร์เซ็นต์ผลิตผลกลับคืน

จากการทดลองในการศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิของระบบทั้งในระบบแบบพีชและคอลัมน์ มีแนวโน้มพบว่าเมื่อควบคุมอุณหภูมิของระบบให้สูงขึ้น จะพบว่าความแตกต่างระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซับและค่าเปอร์เซ็นต์การชะกรดจิบเบอเรลลิกเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ในขั้นตอนการดูดซับ ค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกที่คำนวณได้ โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่เหลืออยู่ในน้ำหมักหรือไม่ถูกดูดซับโดยเรซิน แล้วคิดว่ากรดจิบเบอเรลลิกที่ไม่อยู่ในน้ำหมักนั้นเป็นปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ถูกดูดซับ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ไม่อยู่ในน้ำหมักนั้นอาจถูกดูดซับบนเรซินตามที่คาดไว้จริง หรืออาจ

ถูกทำลายไปบางส่วนในภาวะนั้นได้ ถ้าเป็นภาวะที่มีผลต่อความเสถียรของกรดจิบเบอเรลลิน ซึ่ง
มีผลทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซับที่ได้มีค่าสูงเกินกว่าความเป็นจริง ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่า
อุณหภูมิของระบบที่ต่ำ มีแนวโน้มจะให้ผลิตผลกลับคืนสูงกว่าระบบที่ควบคุมอุณหภูมิสูง ทั้งยัง
เป็นการรักษาเสถียรภาพของกรดจิบเบอเรลลิน โดยการหลีกเลี่ยงจากการถูกทำลายด้วยความ
ร้อน

4.1.2.2 ปัจจัยของอัตราการไหล

อัตราการไหลของระบบทดลองแปรโดยใช้ค่า space velocity (SV) หน่วย
ชม.⁻¹ ตามสูตรการคำนวณตามวิธีการทดลองข้อ 2.6.3 เพื่อให้หน่วยอัตราการไหลสัมพันธ์เทียบกับ
กับหน่วยปริมาตรคอลัมน์ ผลการแปรอัตราการไหลทั้งสองขั้นตอน อัตราการไหลในขั้นตอน
การดูดซับและการชะที่ต่ำลงมีผลให้เปอร์เซ็นต์การดูดซับและเปอร์เซ็นต์ผลิตผลกลับคืนสูงขึ้น
อัตราการไหลที่ต่ำลงคือ การเพิ่มเวลาให้กับกรดจิบเบอเรลลินในการเข้าเกาะเรซินได้มากขึ้นในขั้น
ตอนการดูดซับ และให้เวลากับตัวชะในการชะเอากรดจิบเบอเรลลินที่เรซินได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

จากรายงานในเอกสารสิทธิบัตร Brit. Patent GB 847,435 (Merck & Co.,
1960) ได้ทำการแยกกรดจิบเบอเรลลินด้วยแอนไอออนเรซินชนิด strong เช่นเดียวกับในงานวิจัย
นี้ พบว่ามีความคล้ายคลึงและข้อแตกต่างดังแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงและข้อแตกต่างของรายละเอียดในการแยกกรด
 จิบเบอเรลลินระหว่างงานวิจัยนี้กับของ Merck & Co.(1960)

ข้อเปรียบเทียบ	งานวิจัยนี้	Merck & Co.(1960) [Brit. Patent GB 847,435]
แอนไอออนเรซิน	Quaron AU-808	Dowex 1-X2
แหล่งที่มาของ GA ₃	น้ำหมักของ <i>Gibberella fujikuroi</i> ความเข้มข้นกรดจิบเบอเรลลิน 440.57 มก./ล. ปรับค่า pH เริ่มต้นเป็น 8.0 ปริมาตร 200 มล.	สารละลายน้ำของ กรดจิบเบอเรลลิน ความเข้มข้น 830 มก./ล. ปริมาตร 1 ลิตร
อุณหภูมิของระบบ	25°C	ไม่ได้ระบุไว้
ปริมาตรเรซินที่ใช้	23.25 มล.	50 มล.
สารละลายที่ใช้ล้าง GA ₃ ส่วนเกินจากเรซิน	เมทานอล	เมทานอล
สารละลายตัวชะ	สารละลาย 91%เมทานอลที่มี 9%(w/v)กรดไฮโดรคลอริก	สารละลาย 93%เมทานอลที่มี 7%(w/v)กรดไฮโดรคลอริก
ปริมาณ GA ₃ ในสาร ละลายที่ชะได้ (eluate)	19 มก.	780 มก.
%Recovery	33.13%ของปริมาณการดูดซับ	94%ของปริมาณตั้งต้น

จากการเปรียบเทียบงานวิจัยนี้กับในรายงานของ Merck & Co. พบว่าแม้จะใช้น้ำแอนไอออนเรซินชนิด strong ซึ่งเป็นประเภทเดียวกัน แต่ยังมีข้อแตกต่างในรายละเอียดเช่น แหล่งที่มาของกรดจิบเบอเรลลิน ซึ่งในงานวิจัยนี้ศึกษาการแยกกรดจิบเบอเรลลินจากน้ำหมักของเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* ซึ่งมีสิ่งปนเปื้อนที่สามารถส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการแยกต่ำลงกว่าการแยกกรดจิบเบอเรลลินบริสุทธิ์ในรูปสารละลายน้ำ นอกจากนั้นยังพบว่าในรายงานของ Merck & Co.ไม่ได้ระบุอุณหภูมิของระบบ ซึ่งจากการทดลองในงานวิจัยพบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญต่อการดูดซับและการชะกรดจิบเบอเรลลิน จึงเป็นข้อสังเกตหนึ่งซึ่งอาจทำให้ประสิทธิภาพการแยกกรดจิบเบอเรลลินของงานวิจัยนี้แตกต่างกับรายงานของ Merck & Co.

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิของระบบเมื่อแปรอุณหภูมิของระบบในช่วง 25-40 องศาเซลเซียส พบว่ามีแนวโน้มว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่าจะให้ค่าผลิตผลกลับคืนสูงขึ้น นอกจากนี้ความร้อนยังมีผลต่อเสถียรภาพของกรดจิบเบอเรลลิก โดยกรดจิบเบอเรลลิกจะถูกทำลายได้อย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในรูปสารละลายน้ำหรือมีน้ำเจือปนที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นจึงควรลองแปรอุณหภูมิของระบบให้ต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส

ควรเพิ่มขนาด bed volume ในการศึกษาในระบบคอลัมน์ เพื่อให้ได้ผลิตผลกลับคืนในปริมาณมากเกินพอที่จะใช้ทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์กรดจิบเบอเรลลิกที่ได้

จากโครมาโตแกรม HPLC ของสารละลายที่ชะได้จากเรซิน พบว่าปรากฏพีคของสารอื่นเพิ่มขึ้นมากมายเมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรม HPLC ของน้ำหมักกรดจิบเบอเรลลิกตั้งต้น ซึ่งอาจทำการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลหรือชนิดของสารที่ปรากฏในโครมาโตแกรม HPLC เพราะอาจเป็นจิบเบอเรลลินชนิดอื่น อนุพันธ์หรือโมเลกุลของกรดจิบเบอเรลลิกที่ถูกทำลายบางส่วน เพื่อยืนยันว่าภาวะของระบบนั้นๆมีผลต่อเสถียรภาพของกรดจิบเบอเรลลิกหรือไม่