รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การหาปริมาณฮอร์โมนพืช กลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ในน้ำหมักชีวภาพ

Determination of Brassinosteroids Plant Hormones in Bioextracts

ผู้วิจัย

ผศ.ดร.นภา ตั้งเตรียมจิตมั่น
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ทุนอุดหนุนโครงการวิจัยงบประมาณเงินรายได้
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๔

บทคัดย่อ

วิธีวิเคราะห์ทางสเปกโทรฟลูออโรเมทรีได้ถูกพัฒนาขึ้นสำหรับการหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ โดยเทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ การวิเคราะห์อาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างบราสสิโนไลด์ และ*เมตา*-แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด สภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา มีดังนี้ ใช้ *เมตา*-แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 90 ไมโครโมลาร์ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 นาที ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นและการคายแสง สำหรับการตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ 380 และ 505 นาโนเมตร ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 1-50 ไมโครโมลาร์ ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (3*SD/m*) คือ 38 นาโนโมลาร์ และขีดจำกัดในการหาปริมาณ (10*SD/m*) คือ 127 นาโนโมลาร์ วิธีการเติมสารละลายมาตรฐานถูกนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ โดยไม่ต้องมีการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก

Abstract

A spectrofluorometric method was developed for quantitative determination of brassinosteroids plant hormones, which equivalent to brassinolide. The determination based on the reaction between brassinolide and *m*-dansylaminophenylboronic acid. The 90 μM of *m*-dansylaminophenylboronic acid solution was chosen as the optimal concentration of the reagent. The temperature of the reaction was 30°C (room temperature) for 20 min duration time in 5 mM phosphate buffer solution, pH 7. The excitation and emission wavelength were 380 nm and 505 nm, respectively. Under optimal condition, linearity was found in a range of 1-50 μM. Limit of detection (3*SD/m*) of 38 nM and limit of quantitation (10*SD/m*) of 127 nM were obtained by this method. Standard addition was used for the brassinosteroids determination in bio-extract samples, without any sample preparation.

สารบัญ

สารบัญ (ต่อ)

สารบัญตาราง

ตารางที่

สารบัญรูป

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ฮอร์โมนพืช (Plant hormones) คือ สารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นเองตามธรรมชาติในปริมาณน้อยและความเข้มข้นต่ำ (10^{-6}-10^{-5} โมลาร์) ฮอร์โมนพืชถูกสร้างขึ้นในส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่นใบอ่อน ราก หรือลำต้น แล้วลำเลียงไปยังเนื้อเยื่อในบริเวณต่างๆ ที่จำเพาะของพืชนั้นๆ และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีระของพืช ฮอร์โมนพืชนี้มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช การขยายพันธุ์ การเร่งการออกดอก การติดผล การเพิ่มขนาดผล เป็นต้น (อานัฐ ตันโช, 2555)

เมื่อกล่าวถึงฮอร์โมนพืชที่เป็นที่รู้จักกันดี มีอยู่ 5 กลุ่ม ได้แก่ ออกซิน (Auxins), จิบเบอเรลลิน (Gibberellins), ไซโตไคนิน (Cytokinins), กรดแอบไซซิก (Abscisic acids), และเอทธิลีน (Ethylene) จนกระทั่งในปี ค.ศ.1970 ได้มีการค้นพบฮอร์โมนพืชกลุ่มใหม่ที่มีชื่อว่า “บราสสิโน สเตียรอยด์ (Brassinosteroid)” จากสารสกัดละอองเกสรของดอกผักกาดก้านขาว (Rape pollen) Brassica napus (Mitchell, J. W., Mandava, N. B., Worley, J. F., Plimmer, J. R., and Smith, M. V., 1970; Pachthong, C., Supyen, D., Buddhasukh, D., and Jatisatienr, A., 2006) บราสสิโนสเตียรอยด์จัดเป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ช่วยในการเจริญเติบโตของพืชได้ดีมาก โดยใช้ในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับฮอร์โมนพืชกลุ่มอื่นๆที่กล่าวมา ปัจจุบันมีฮอร์โมนมากกว่า 60 ชนิดในกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ที่ถูกค้นพบและมีรายงานสูตรโครงสร้าง (Borisevich, N. A., Raichenok, T. F., Khripach, V. A., Zhabinskii, V. N., and Ivanova, G. V., 2008) โดยฮอร์โมนกลุ่มนี้จะอยู่ในรูปสเตียรอยด์อิสระ หรืออยู่กับสารประกอบน้ำตาล และกรดไขมัน สามารถพบได้ในพืชหลากหลายชนิดมาก ทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ใบเลี้ยงคู่ พืชไร้ดอก (จิมโนสเปิร์ม) เฟิร์น และสาหร่าย โดยพบปริมาณมากที่สุดในเกสรของพืช และในเมล็ดอ่อน (Immature seeds) หรือเมล็ดที่งอก (Germinated seeds) โดยพบอยู่ในช่วง 1-100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Adam, G., and Marquardt, V., 1986) พบรองลงมาในดอกตูม และในใบ โดยพบอยู่ในช่วง 0.01-0.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Srivastava, L. M., 2002)

บราสสิโนไลด์ (Brassinolide) เป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ตัวแรกที่ถูกค้นพบ และเป็นสารตัวที่พบมาก เช่นเดียวกับแคสตาสเตอโรน (Castasterone) ซึ่งมีรายงานว่าเป็นผลิตภัณฑ์จากการเกิดเมตาบอลิกของบราสสิโนไลด์ และสารฮอร์โมนหลายตัวในกลุ่มบราสสิโน สเตียรอยด์ พบว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่เปลี่ยนมาจากสารตั้งต้นบราสสิโนไลด์ โดยการสังเคราะห์ทางชีวภาพ นอกจากนี้บราสสิโนไลด์ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าแคสตาสเตอโรนถึง 5 เท่า (Clouse, S. D.,

2004) จากข้อมูลเหล่านี้บราสสิโนไลด์ จึงถูกสังเคราะห์ขึ้นและนำมาใช้ประโยชน์เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของพืชควบคู่กับการให้ปุ๋ย โดยพบได้จากรายงานการวิจัยของภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ศึกษาผลของฮอร์โมนบราสสิโนสเตียรอยด์กับการเจริญ เติบโตของดอกเอื้องขาม และของลำไยพันธุ์ดอ (ชรัสนันท์ ตาชม, 2548; ณัฐพงศ์ สัตยพานิช, 2552) สำหรับการใช้สารสังเคราะห์บราสสิโนไลด์ โดยตรงจะต้องนำมาเจือจางลงในอัตราส่วนที่สูงมาก เพราะพืชต้องการในปริมาณที่น้อย หากใส่เยอะเกินอาจทำให้พืชตายได้ และในปัจจุบันแนวคิดวิถีเกษตรอินทรีย์กำลังได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก โดยน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากการหมักผัก หรือผลไม้กับน้ำตาล ได้ถูกนำมาใช้ทดแทนปุ๋ยเคมี ฉะนั้นการเลือกวัตถุดิบสำหรับการหมักจึงเป็นสิ่งที่สำคัญอย่างหนึ่ง เนื่องจากจะทำให้น้ำหมักที่ได้มีปริมาณของธาตุอาหารหรือฮอร์โมนที่เพียงพอและเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชมากยิ่งขึ้น

โดยทั่วไปแล้ว การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์สามารถทำได้โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับสารประกอบในกลุ่มบอโรนิค แอซิด และทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่มีฟลูออเรสเซนซ์เป็นตัวตรวจวัด (Gamoh, K., Kitsuwa, T., Takatsuto, S., Fujimoto, Y., and Ikekawa, N., 1988; Gamoh, K., Okamoto, N., Takatsuto, S., and Tejima, I., 1990; Gamoh, K., Omote, K., Okamoto, N., and Takatsuto, S., 1989;Gamoh, K., and Takatsuto, S., 1989; Takatsuto, S., Omote, K., Gamoh, K., and Ishibashi, M., 1990; Winter, J., Schneider, B., Meyenburg, S., Strack, D., and Adam, G., 1999) นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคทางแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรีอีกด้วย (Pachthong, C., Supyen, D., Buddhasukh, D., and Jatisatienr, A., 2006) อย่างไรก็ตาม เทคนิคการวิเคราะห์เหล่านั้นมีวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ค่อนข้างยุ่งยาก และใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำเสนอวิธีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์รวมด้วยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมทรี โดยเทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชตัวแรกที่ถูกค้นพบ และมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าฮอร์โมนพืชตัวอื่นๆในกลุ่มเดียวกัน (Pattanachatchai, N., 2010; Srivastava, L. M., 2002) เทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมทรี เป็นเทคนิคที่มีสภาพไว มีความเลือกเฉพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์สูง สามารถใช้งานง่าย เครื่องมือมีราคาถูกเมื่อเทียบกับเทคนิคทางโครมาโตกราฟี โดยกระบวนการวิเคราะห์อาศัยการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่างบราสสิโนไลด์ และรีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาและนำเสนอขึ้นนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ที่มีอยู่ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ และปุ๋ยน้ำชีวภาพได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับการหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์โดยเทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ด้วยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมทรี

2. เพื่อทำการหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง เช่น น้ำหมักชีวภาพ ปุ๋ยน้ำอินทรีย์ เป็นต้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้วิธีวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ โดยเทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ที่ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย ประหยัดสารเคมีและสารตัวอย่าง

2. ได้ทราบปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ที่มีอยู่ในน้ำหมักชีวภาพจากพืชท้องถิ่นชนิดต่างๆ และในปุ๋ยน้ำอินทรีย์

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์โดยเทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ด้วยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมทรี

2. ประเมินวิธีวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ด้วยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมทรี โดยการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) กราฟมาตรฐาน ความเที่ยง ผลของน้ำตาลต่อการรบกวนการวิเคราะห์ และค่าร้อยละการได้กลับคืน

3. นำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษามาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ ที่เตรียมขึ้นเองจากพืชท้องถิ่นและตัวอย่างปุ๋ยน้ำอินทรีย์ที่มีขายอยู่ในท้องตลาด

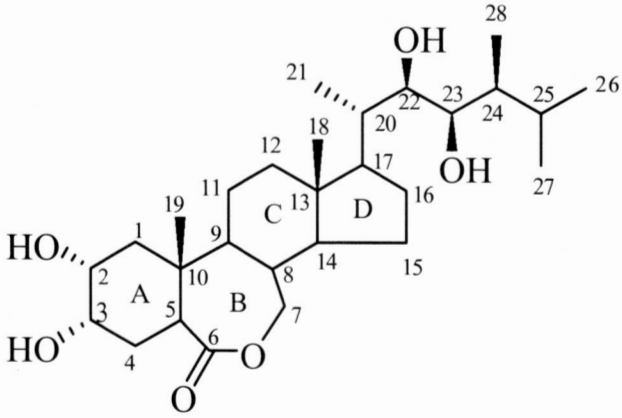
บทที่ 2
ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ฮอร์โมนพืชบราสสิโนไลด์ (Brassinolide)

พืชเป็นสิ่งมีชีวิตที่เจริญเติบโต โดยสะสมพลังงานจากแสงอาทิตย์มาสร้างโมเลกุลที่ใหญ่และซับซ้อนอย่างต่อเนื่องจากไอออนและโมเลกุลของสารที่มีขนาดเล็ก ซึ่งเป็นวัตถุดิบในการเจริญเติบโต การเจริญเติบโตของพืช ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณแสง อาหาร น้ำ ชนิดของดิน แร่ธาตุต่างๆในดิน อุณหภูมิ สารควบคุมการเจริญเติบโต และฮอร์โมนพืช เป็นต้น (นพดล จรัสสัมฤทธิ์, 2537; พีรเดช ทองอำไพ, 2537)

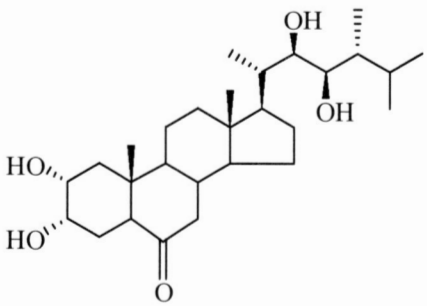
ฮอร์โมนพืช (Plant hormones) คือ สารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นในส่วนใดส่วนหนึ่ง เช่น ใบอ่อน ราก หรือลำต้น แล้วลำเลียงไปยังส่วนอื่นๆ และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีระของพืช มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช การขยายพันธุ์ การเร่งการออกดอก การติดผล การเพิ่มขนาดผล เป็นต้น ฮอร์โมนพืชที่พืชสร้างขึ้นนี้จะอยู่ในระดับน้อยมากที่ 10^{-6}-10^{-5} โมลาร์ (อานัฐ ตันโช, 2555) ฮอร์โมนพืชที่รู้จักกันดี มีอยู่ 5 กลุ่ม ได้แก่ ออกซิน (Auxins), ไซโตไคนิน (Cytokinins), จิบเบอเรลลิน (Gibberellins), กรดแอบไซซิก (Abscisic acids) และเอทธิลีน (Ethylene) ต่อมาในปี ค.ศ. 1970 ได้มีการค้นพบฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ (BRs) ในสารที่สกัดจากเกสรดอกไม้ โดยบราสสิโนสเตียรอยด์ จัดเป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ช่วยในการเจริญเติบโตของพืชได้ดีมาก โดยใช้ในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับฮอร์โมนพืชกลุ่มอื่นๆ ที่กล่าวมา ออกฤทธิ์ได้ในระดับนาโนโมลาร์หรือต่ำกว่า (Hooley, R., 1996) ปัจจุบันมีฮอร์โมนมากกว่า 60 ชนิดในกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ที่ถูกค้นพบและมีรายงานสูตรโครงสร้าง (Bajguz, A., and Tretyn, A., 2003) โดยสารกลุ่มนี้จะอยู่ในรูปสเตียรอยด์อิสระ หรืออยู่กับสารประกอบน้ำตาลและกรดไขมัน สามารถพบได้ในพืชหลากหลายชนิดมาก ทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ใบเลี้ยงคู่ พืชไร้ดอก (จิมโนสเปิร์ม) เช่น เฟิร์น เกสรของถั่วลันเตา เกสรของข้าวโพด เกสรดอกทานตะวัน เกสรดอกบัควีท เกสรดอกส้ม เมล็ดต้นเอ็ลดา ใบชาเขียว ใบต้นเกาลัค ใบสาหร่าย ถั่วเหลือง ถั่วลิสงเถา (Pinto peanut) เป็นต้น (Takatsuto, S., 1994)

บราสสิโนสเตียรอยด์ตัวแรกที่ถูกค้นพบ คือ บราสสิโนไลด์ (Brassinolide) โครงสร้าง ดังในรูปที่ 2-1 มีวง 4 วงติดกันและมีคาร์บอน 28 ตัวต่อกันเป็นโครงสร้างหลัก ตัวอื่นๆจะแตกต่างกันที่จำนวนของหมู่ไฮดรอกซิลที่ต่ออยู่กับวง A การมีหรือไม่มีกลุ่มคีโตน หรือแลกโตนที่ต่ออยู่กับคาร์บอนตัวที่ 6 ในวง B หรือชนิดของหมู่ต่างๆที่มาต่ออยู่กับโครงสร้างหลัก และการวางตัวของหมู่ต่างๆที่มาต่ออยู่กับโครงสร้างหลัก (Zullo, M. A. T., and Adam, G., 2002)



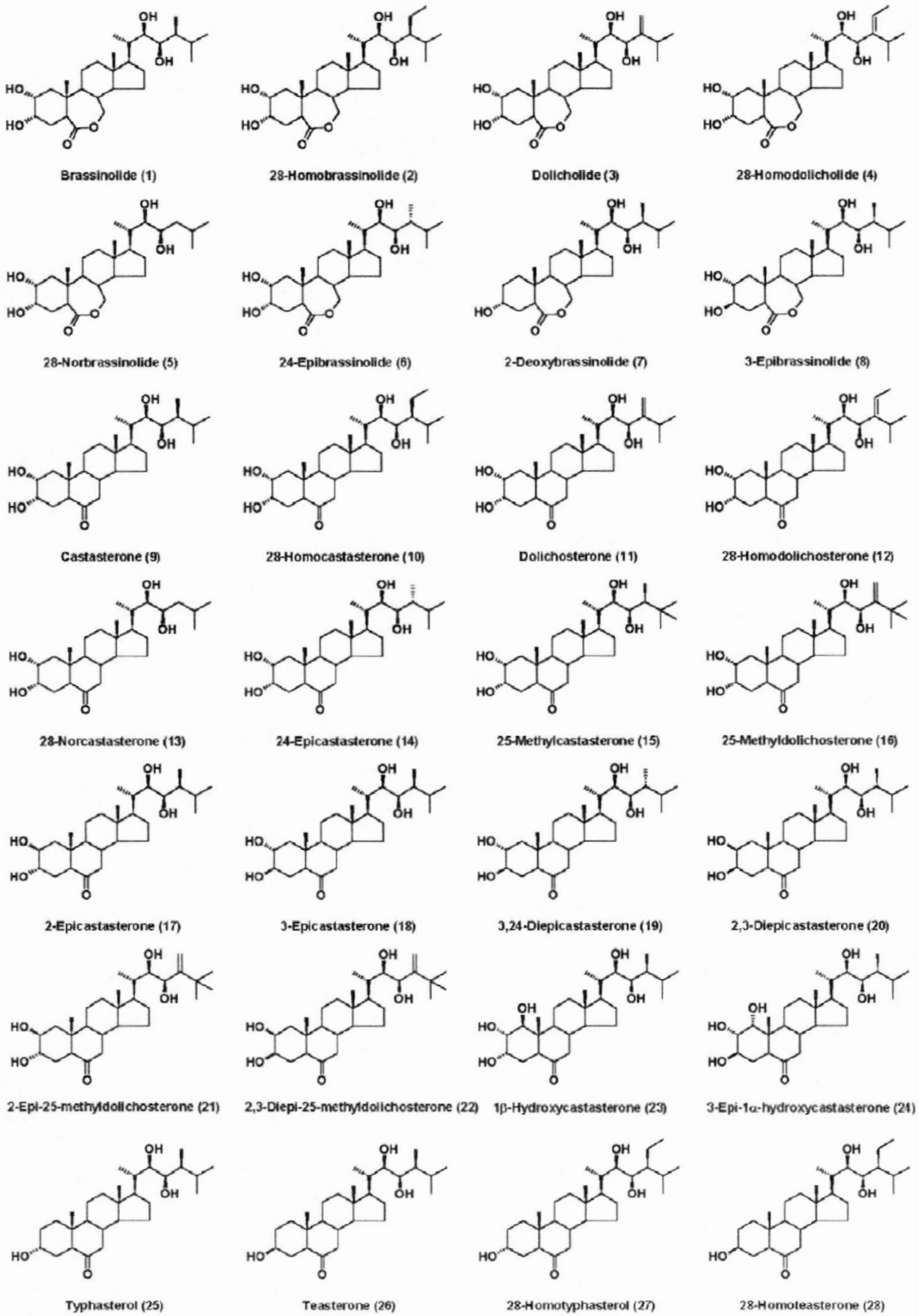
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของบราสสิโนไลด์ (Brassinolide) มีคาร์บอน 28 ตัวเป็นโครงสร้างหลัก

นอกจากบราสสิโนไลด์ ฮอร์โมนที่เป็นที่รู้จักและพบมากอีกตัวในกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ คือ แคสตาสเตอโรน (Castasterone) โครงสร้างแสดงดังในรูปที่ 2-2 แคสตาสเตอโรนเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากเมตาบอลิกของบราสสิโนไลด์ และสารฮอร์โมนหลายตัวในกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ จะเห็นได้ว่าโครงสร้างของบราสสิโนไลด์จะคล้ายกับโครงสร้างของแคสตาสเตอโรนมาก แต่บราสสิโนไลด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าแคสตาสเตอโรนถึง 5 เท่า (Clouse, S. D., 2004) จึงถูกนำมาใช้ในทางการเกษตรมากกว่า

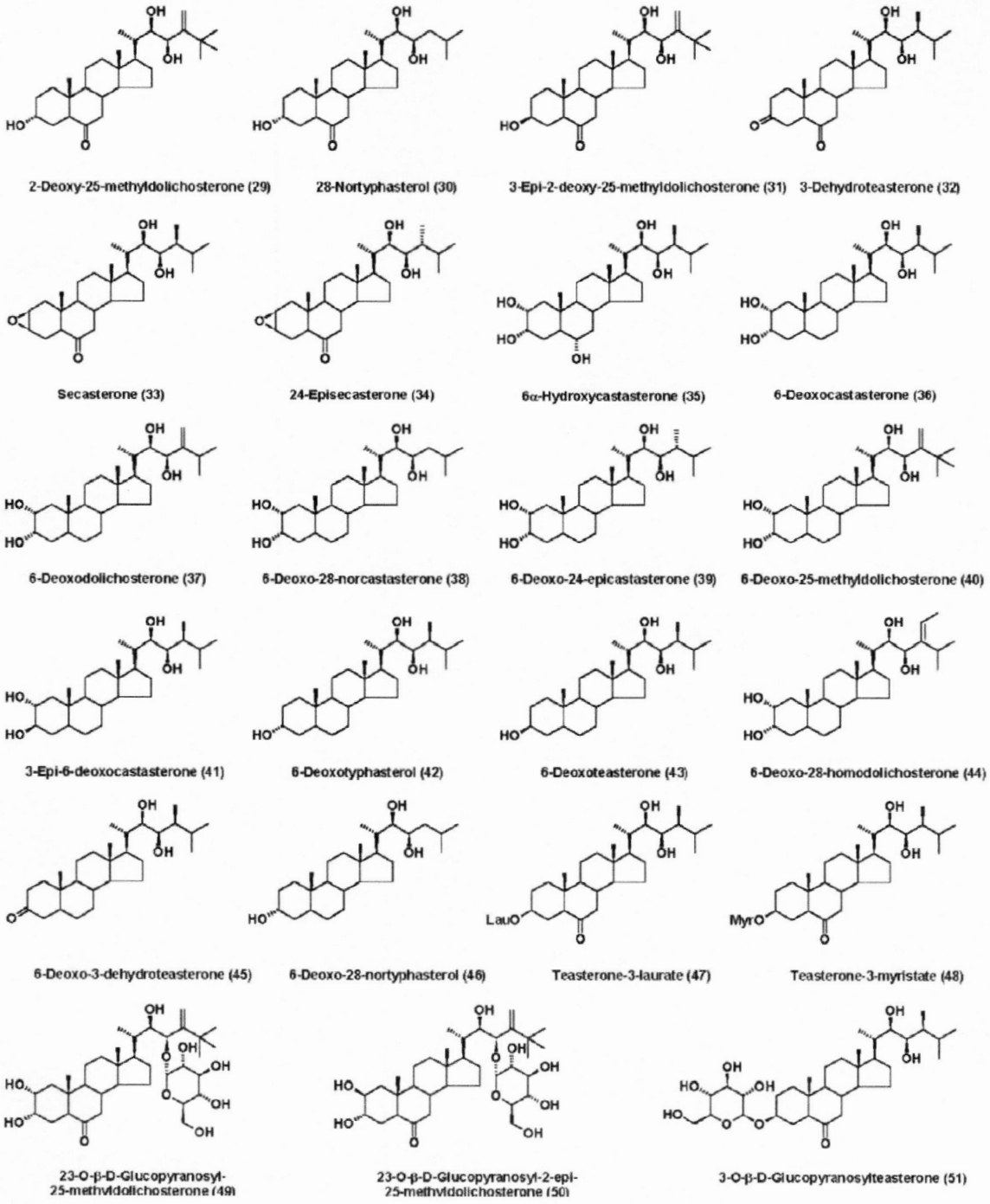


รูปที่ 2.2 โครงสร้างของแคสตาสเตอโรน (castasterone)

ฮอร์โมนตัวอื่นๆในกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ที่มีรายงานอีก 51 ตัว มีสูตรโครงสร้างดังในรูปที่ 2.3 และมีชื่อเรียกต่างๆกันออกไปดังแสดงใต้สูตรโครงสร้าง (Clouse, S. D., 2004)



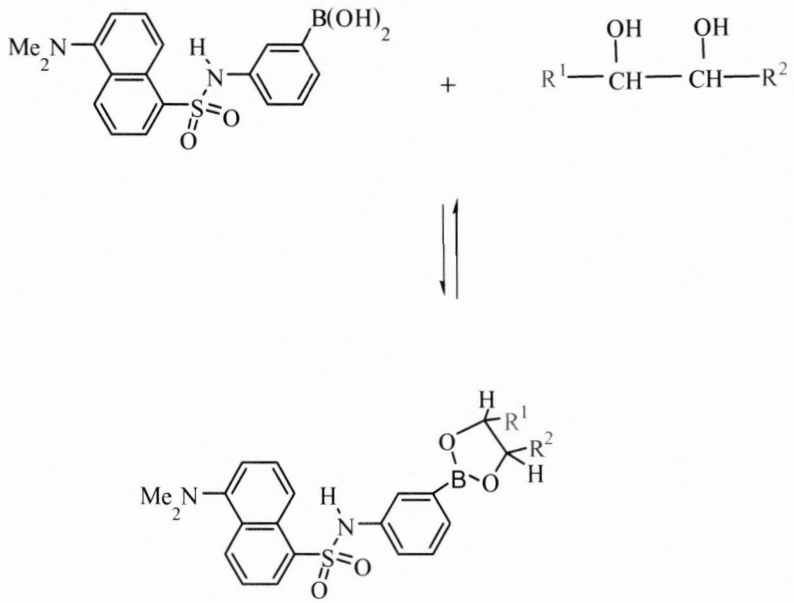
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของฮอร์โมนกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของฮอร์โมนกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ (ต่อ)

การวิเคราะห์บราสสิโนสเตียรอยด์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์

แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ใช้เป็นตัวตรวจวัดทางเคมีเชิงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent chemosensor) และถูกใช้เป็นรีเอเจนต์กันอย่างแพร่หลายสำหรับการทำอนุพันธ์กับน้ำตาลฟรุกโตสหรือน้ำตาลชนิดอื่นๆ (Crespo-Otero, R., Suardiaz, R., Pina-Luis, G., Valdes, M. G., Diaz-Garcia, M. E., and Montero, L. A., 2008;Luis, G. P., Granda, M., Badia, R., and Diaz-Garcia, M. E., 1998) โดยแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด เป็นฟลูออโรฟอร์ที่เกิดปฏิกิริยากับหมู่ไดออล (Vicinal diols) (หมู่ไฮดรอกซิลบนอะตอมของคาร์บอนที่อยู่ติดกัน) และอะมิโนแอลกอฮอล์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารเชิงซ้อนที่มีลักษณะเป็นวง (ดังรูปที่ 2.4) (Gamoh, K., Okamoto, N., Takatsuto, S., and Tejima, I., 1990;Gamoh, K., Omote, K., Okamoto, N., and Takatsuto, S., 1989;Takatsuto, S., Omote, K., Gamoh, K., and Ishibashi, M., 1990;Winter, J., Schneider, B., Meyenburg, S., Strack, D., and Adam, G., 1999)



รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาของแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด กับหมู่ไดออล (Vicinal diols) เกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่มีลักษณะเป็นวงที่สามารถให้ฟลูออเรสเซนซ์ได้ (-, 2555)

ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์และความยาวคลื่นที่เกิดพีคขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมรอบๆแดนซิลที่เป็นฟลูออโรฟอร์ และจากรูปที่ 2.3 จะสังเกตได้ว่าฮอร์โมนเกือบทุกตัวในกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์มีหมู่ไดออล ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 (รูปที่ 2.3) กลุ่มนี้จะมีชื่อเรียกว่า Side-chain

cis-diol ดังนั้นบราสสิโนสเตียรอยด์จึงสามารถเกิดปฏิกิริยากับรีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิคแอซิด (Dansylaminophenyl boronic acid) ให้ผลิตภัณฑ์ที่วัดการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้

น้ำหมักชีวภาพ (Bio-extract)

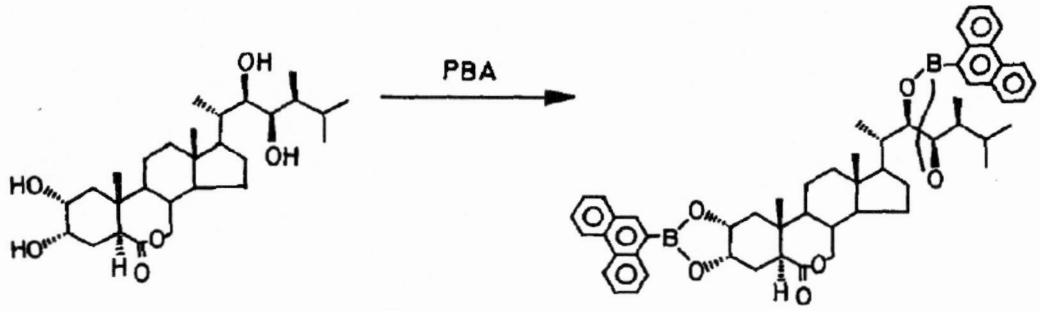
น้ำหมักชีวภาพหรือน้ำสกัดชีวภาพ เป็นสารละลายเข้มข้นที่ได้จากการหมักเศษพืชหรือสัตว์ (เยาวพา จิระเกียรติกุล และ นฤมล วชิรปัทมา, 2551) หรือเป็นของเหลวที่ได้มาจากวิธีการสกัดน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบอินทรีย์โดยใช้น้ำตาลหรือกาก น้ำตาล (Molasses) ใส่ลงไปจะได้น้ำเลี้ยงที่สกัดออกมาเป็นสีน้ำตาล โดยขบวนการ "พลาสโมไลซีส (Plasmolysis)" ซึ่งมีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่ทำหน้าที่ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ให้มีโมเลกุลเล็กลงตามลำดับ โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งให้อาหารและพลังงานของจุลินทรีย์ สามารถหมักได้ทั้งในสภาพที่มี และไม่มีออกซิเจน น้ำสกัดชีวภาพหรือน้ำหมักชีวภาพที่ได้นี้จะมีทั้งจุลินทรีย์ธรรมชาติที่เกิดขึ้นหลากหลายชนิด รวมทั้งมีสารประกอบที่สกัดได้จากเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ชนิดต่างๆ ได้แก่ สารพวกคาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน ฮอร์โมน เอนไซม์ และอื่นๆ น้ำสกัดชีวภาพจะเกิดขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำเลี้ยงในต้นพืช โดยปกติน้ำเลี้ยงในต้นพืชสดจะมีอยู่ประมาณ 90-98 เปอร์เซ็นต์ ถ้าส่วนของพืชมีน้ำมาก น้ำสกัดก็จะเกิดขึ้นมาก ภายในระยะเวลาเพียง 2-3 วัน แต่เนื่องจากขบวนการทำในระยะแรกเกี่ยวข้องกับขบวนการสกัดน้ำเลี้ยงจากเซลล์ทางชีวภาพ (Bio-extract) และในช่วงหลัง เกี่ยวข้องกับขบวนการหมัก ดังนั้นนักวิชาการบางกลุ่มจึงเรียกน้ำสกัดชีวภาพว่า "น้ำหมักชีวภาพ" (มุกดา สุขสวัสดิ์, 2545;เยาวพา จิระเกียรติกุล และ นฤมล วชิรปัทมา, 2551)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Gamoh, K., Kitsuwa, T., Takatsuto, S., Fujimoto, Y., and Ikekawa, N. (1988) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ 7 ตัว ได้แก่ บราสสิโนไลด์ แคสตาสเตอโรน บราสสิโนน 28-นอร์บราสสิโนไลด์ 28-โฮโมบราสสิโนไลด์ 28-โฮโมแคสตาสเตอโรน และโดลิคลอสเตอโรน ในเกสรของถั่วปากอ้า (Broad bean) โดยการทำอนุพันธ์ที่หมู่ไดออล (Vicinol diol) กับ 1-แนพธาลีนบอโรนิค แอซิด (1-Naphthaleneboronic acid) ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่มีดีเทคเตอร์เป็นยูวี-วิสิเบิ้ล ที่ 280 นาโนเมตร โดยใช้คอลัมน์ ODS (C-18) และใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตรไนไตร์ลกับน้ำ ($CH_3CN:H_2O$) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เพื่อแยกฮอร์โมนแต่ละตัวออกจากกันที่รีเทนชันไทม์ต่างๆ จากโครมาโตแกรมพบว่า สามารถแยกฮอร์โมนทั้ง 7 ตัวออกจากกันได้ในเวลา 18 นาที และมีค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนไลด์อยู่ในช่วง 88.6-95.5

เปอร์เซ็นต์ (n=4, 2.9%RSD) นอกจากนี้ยังรายงานว่าวิธีนี้สามารถวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนไลด์ได้ต่ำถึงระดับ 100 พิโคกรัม

Gamoh, K., Omote, K., Okamoto, N., and Takatsuto, S. (1989) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ได้แก่ บราสสิโนไลด์ โฮโมบราสสิโนไลด์ นอร์บราสสิโนไลด์ แคสตาสเตอโรน โฮโมแคสตาสเตอโรน นอร์แคสคาสเทอโรน และโดลิคลอสเตอโรน ในเกสรของถั่วปากอ้า (Broad bean, *Vicia faba L.)* โดยการทำอนุพันธ์กับ 9-ฟีแนนทรีน บอโรนิค แอซิด (9-Phenanthreneboronic acid) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) ไพริดีน-อะซิโตรไนไตร์ล ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (ดังรูปที่ 2.5) จากนั้นตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่มีดีเทคเตอร์เป็นฟลูออเรสเซนซ์ ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น คือ 305 นาโนเมตร (λ_{ex}) และตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่คายออกมาที่ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตร (λ_{em}) โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตรไนไตร์ลกับน้ำ ($CH_3CN:H_2O$) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ในอัตราส่วน 90:10 ที่อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที แยกในคอลัมน์ ODS (C-18) จากการวิเคราะห์พบว่า มีปริมาณของบราสสิโนไลด์ โดลิคลอ สเตอโรน นอร์แคสคาสเทอโรน และแคสตาสเตอโรน เท่ากับ 180.8± 3.1, 536.5± 4.5, 628.4± 3.6 และ 134.4± 2.2 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ



รูปที่ 2.5 ปฏิกิริยาของบราสสิโนไลด์ กับ 9-ฟีแนนทรีนบอโรนิค แอซิด
(9-Phenanthreneboronic acid, PBA)

Gamoh, K., and Takatsuto, S. (1989) ได้ศึกษาการทำอนุพันธ์ของบราสสิโนสเตียรอยด์ โดยใช้ รีเอเจนต์ที่เป็นอนุพันธ์ของกรดบอโรนิค คือ 1-ไซยาโนไอโซอินโดล-2-*เมตา*-เฟนิลบอโรนิค แอซิด (1-cyanoisoindole-2-*m*-phenylboronic acid) ซึ่งเตรียมได้จาก*ออร์โธ*-แพทธาลาดีไฮด์ (*o*-phthalaldehyde) และ*เมตา*-อะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (*m*-aminophenylboronic acid) ปฏิกิริยาการทำอนุพันธ์ของบราสสิโนสเตียรอยด์กับรีเอเจนต์จะทำในสารละลายผสมของอะซิ

โตรไนไตร์ลที่มีไพริดีนอยู่ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ แล้วทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น คือ 330 นาโนเมตร (λ_{ex}) และความยาวคลื่นที่สารคายแสงที่ 400 นาโนเมตร (λ_{em}) พบว่าอนุพันธ์ของบราสสิโนสเตียรอยด์กับรีเอเจนต์บอโรเนตมีขีดจำกัดการตรวจวัดที่ 20 พิโคกรัม (S/N = 3) นอกจากนี้รีเอเจนต์ที่ศึกษามีข้อดี คือ มีสภาพไวในการวิเคราะห์สูง เมื่อเทียบกับอนุพันธ์ของกรดบอโรนิคชนิดอื่นที่นิยมใช้ เช่น 9-ฟีแนนทรีนบอโรนิค แอซิด (9-phenanthreneboronic acid) และมีความเฉพาะเจาะจงในการทำปฏิกิริยาสูง คือ ทำปฏิกิริยาที่หมู่ ไดออล (1,2-diol group)

Gamoh, K., Okamoto, N., Takatsuto, S., and Tejima, I. (1990) ได้สังเคราะห์รีเอเจนต์ตัวใหม่สำหรับใช้วิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนบราสสิโนสเตียรอยด์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งมีดีเทคเตอร์เป็นเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ รีเอเจนต์ตัวนี้คือ *เมตา*-อะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (*m*-dansylaminophenylboronic acid, DABA) การเตรียมอนุพันธ์ แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโนเนต (Dansylaminophenylboronates) ทำได้โดยนำแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 10 มิลลิกรัม ละลายใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไพริดีนในอะซิโตรไนไตร์ล 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในฮอร์โมนบราสสิโนสเตียรอยด์ที่สกัดจากเกสรพืช ปิดฝาหลอดทดลอง นำไปให้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็น และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตรวจวัดด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ ค่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น คือ 345 นาโนเมตร (λ_{ex}) และค่าความยาวคลื่นที่สารคายแสงออกมาตรวจวัดที่ 515 นาโนเมตร (λ_{em}) รีเอเจนต์ตัวใหม่นี้ ให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 25 พิโคกรัมของสารมาตรฐานบราสสิโนไลด์ (S/N=2) ซึ่งดีกว่ารีเอเจนต์แนพธาลีนบอโรนิค แอซิด (Naphthaleneboronic acid) ที่ให้อนุพันธ์แนพธาลีนบอโรเนต (Naphthaleneboronate)

Takatsuto, S., Omote, K., Gamoh, K., and Ishibashi, M. (1990) ได้ทำการแยกและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของฮอร์โมนบราสสิโนไลด์และแคสตาสเตอโรน ในเกสรดอกบัควีท โดยวิธีวัดการเจริญเติบโตของเมล็ดข้าวส่วนที่งอก (Rice lamina inclination) เกสรดอกบัควีทถูกสกัดด้วยตัวทำละลาย และทำการแยกฮอร์โมนที่สกัดได้ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี แล้วจึงนำมาทำอนุพันธ์กับ 9-ฟีแนนทรีนบอโรนิค แอซิด (9-phenanthreneboronic acid) และแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (Dansylaminophenylboronic acid) ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่มีดีเทคเตอร์เป็นฟลูออเรสเซนซ์ ค่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นและค่าความยาวคลื่นที่สารคายแสงตรวจวัดที่ 305 นาโนเมตร (λ_{ex}) 375 นาโนเมตร (λ_{em}) และ 345 นาโนเมตร (λ_{ex}) 515 นาโนเมตร (λ_{em}) ตามลำดับ ปริมาณของบราสสิโนไลด์และแคสตาสเตอโรน ที่ตรวจวัดได้ เท่ากับ 5.0 และ 7.1 นาโน

กรัมต่อกรัม ตามลำดับ จากนั้นทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของฮอร์โมนบราสสิโนไลด์และแคสตาสเตอโรนในเกสรดอกบัควีท ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี พบว่ามีโมเลกุลลาร์ไอออนของแคสตาสเตอโรน *บิส* มีเทนบอโรเนต (Castasterone *bis*-methaneboronate) ที่มวล/ประจุ 512.3842 และบราสสิโนไลด์ *บิส*มีเทนบอโรเนต (Brassinolide *bis*-methaneboronate) ที่มวล/ประจุ 528.3791 ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าในเกสรดอกบัควีทมีฮอร์โมนพืชที่ใช้ในการศึกษาทั้งสองชนิด

Winter, J., Schneider, B., Meyenburg, S., Strack, D., and Adam, G. (1999) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนบราสสิโนสเตียรอยด์ โดยการเกิดอนุพันธ์ 2 ชนิด (Double-derivatized brassinosteroids) ชนิดแรกเป็นการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฮอร์โมนบราสสิโนสเตียรอยด์กับ แดนซิลไฮดราซีน ที่อุณหภูมิห้อง และทิ้งไว้ 1 คืน จะได้อนุพันธ์แดนซิลไฮดราโซน จากนั้นฮอร์โมนที่เหลือจะถูกทำให้เป็นเบสโดยการเติมไพริดีนก่อนไปทำปฏิกิริยากับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ได้อนุพันธ์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรเนต อนุพันธ์ทั้งสองชนิดนี้ถูกนำไปฉีดผ่านคอลัมน์ LiChrospher 100 RP18 ของเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) มีตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลและน้ำ ($CH_3OH:H_2O$) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เพื่อแยกฮอร์โมนทั้งหมดสารออกจากอื่นๆในตัวอย่าง รวมทั้งรีเอเจนต์ที่ใช้ในการเกิดอนุพันธ์ด้วย และใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตรไนไตร์ลกับน้ำ ($CH_3CN:H_2O$) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เพื่อแยกฮอร์โมนแต่ละตัวออกจากกันที่รีเทนชันไทม์ต่างๆกัน ตรวจวัดปริมาณที่ดีเทคเตอร์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นคือ 230 นาโนเมตร (λ_{ex}) และตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่สารคายแสงออกมาที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (λ_{em}) วิธีนี้ทำให้สามารถตรวจวัดปริมาณของฮอร์โมนบราสสิโนไลด์ได้เกือบทุกตัว

Pachthong, C., Supyen, D., Buddhasukh, D., and Jatisatienr, A. (2006) ได้ศึกษาการแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของบราสสิโนไลด์ และแคสตาสเตอโรนในเกสรดอกฟักทอง (*Cucurbita moschata Duch.*) โดยเกสรดอกฟักทองแห้งจะถูกสกัดด้วยเมทานอล นำไปประเหยตัวทำละลายออก สารสกัดที่ได้จะถูกพาร์ทิชั่นระหว่างน้ำและคลอโรฟอร์ม โดยส่วนที่อยู่ในชั้นคลอโรฟอร์มจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพทดสอบด้วยวิธีวัดการเจริญเติบโตของเมล็ดข้าวส่วนที่งอก (Rice lamina inclination) นำสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมาทำให้บริสุทธิ์แล้วจึงทำอนุพันธ์กับเมทิลบอโรนิคแอซิด (Methylboronic acid) เกิดผลิตภัณฑ์เป็นบราสสิโนไลด์ *บิส*มีเทนบอโรเนต (Brassinolide *bis*-methaneboronate) และแคสตาสเตอโรน *บิส*มีเทนบอโรเนต (Castasterone *bis*-methaneboronate) ตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรีเพื่อแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบที่ได้ทั้งสองชนิด จากผลการวิเคราะห์สามารถระบุได้ว่ามีแคสตาสเตอโรน และบราสสิโนไลด์ เท่ากับ 112 และ 36 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนัก

เกสรดอกฟักทองแห้ง ตามลำดับ และสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตฮอร์โมนพืชจากธรรมชาติ ซึ่งมีราคาถูก สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางเกษตรกรรมได้

Huo, F., Wang, X., Han, Y., Bai, Y., Zhang, W. et al. (2012) ได้นำเสนอรีเอเจนต์ชนิดใหม่ คือ 2-โบรโมไพริดีน-5-บอโรนิค แอซิด (2-bromopyridine-5-boronic acid, BPBA) ที่ใช้ในการทำอนุพันธ์กับบราสสิโนสเตียรอยด์ทั้ง 3 ตัว คือ 24-อีพิบราสสิโนไลด์ 28-โฮโมบราสสิโนไลด์ และ 28-อีพิโฮโมบราสสิโนไลด์ ปฏิกิริยาการทำอนุพันธ์สามารถทำได้ง่าย เพียงการเขย่าด้วยมือที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จะถูกทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Ultra High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Triple Quadrupole Mass Spectrometry (UHPLC-ESI-QqQ-MS) ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตรไนไตร์ลกับน้ำ (CH_3CN:H_2O) ผสมกับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอร์มิก เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) รูปแบบการชะแบบเกรเดียน ที่อัตราการไหล 0.35 มิลลิลิตรต่อนาที วิธีวิเคราะห์ดังกล่าวนี้สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และมีสภาพไวในการวิเคราะห์สูง มีขีดจำกัดการตรวจวัด (S/N=3) ขีดจำกัดการหาปริมาณ (S/N=10) สำหรับบราสสิโนสเตียรอยด์ทั้งสามชนิด มีค่าอยู่ในช่วง 2.00-8.00 นาโนกรัมต่อลิตร และ 6.00-23.00 นาโนกรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีช่วงความเป็นเส้นตรง เท่ากับ 10-10,000 นาโนกรัมต่อลิตร ค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนสเตียรอยด์ มีค่าอยู่ในช่วง 76.9-86.1 เปอร์เซ็นต์ วิธีวิเคราะห์ที่นำเสนอขึ้นใหม่นี้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างสูง เนื่องจากใช้ตัวอย่างพืช *A.thaliana* เพียง 2 กรัมเท่านั้น แต่สามารถทำการหาปริมาณของบราสสิโนสเตียรอยด์ได้ โดยมีค่าเท่ากับ 0.055 นาโนกรัมต่อกรัม และ 0.070 นาโนกรัมต่อกรัม สำหรับ 24-อีพิบราสสิโนไลด์ และ28-อีพิโฮโม บราสสิโนไลด์ ตามลำดับ

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องสเปกโทรฟลูออโรโฟโตมิเตอร์ (spectrofluorophotometer) รุ่น FP-6200 บริษัท Jasco ประเทศญี่ปุ่น และคิวเวตขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ทศนิยม 5 ตำแหน่ง รุ่น AT 261 Delta Range บริษัท Mettler Toledo Co., LTD. ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Φ 34 ของ Beckman

4. ตู้อบ (Oven) รุ่น 1375 FX ของ SHELLAB, Sheldon manufacturing, INC.

5. ไมโครปิเปต (Micropipet) ขนาด 0.1-10 ไมโครลิตร, 10-100 ไมโครลิตร และ 100-1,000 ไมโครลิตร บริษัท Boeco ประเทศเยอรมัน

สารเคมี

1. สารมาตรฐานบราสสิโนไลด์ (Brassinolide: $C_{28}H_{48}O_6$ มวลโมเลกุล 480.68 กรัมต่อโมล) ความบริสุทธิ์ 90% เกรดวิเคราะห์ ของบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหราชอาณาจักร

2. แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (Dansylaminophenylboronic acid, DABA: $C_{18}H_{19}BN_2O_4S$ มวลโมเลกุล 370.23 กรัมต่อโมล) เกรด HPLC ของบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. เมทานอล (Methanol:CH_3OH มวลโมเลกุล 32.04 กรัมต่อโมล) เกรด HPLC ของบริษัท RCI Labscan ประเทศไทย

4. ไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคะไฮเดรต (Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate: $Na_2HPO_4.12\ H_2O$ มวลโมเลกุล 358.14 กรัมต่อโมล) เกรดวิเคราะห์ ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี

5. โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogenphosphate: KH_2PO_4 มวลโมเลกุล 136.09 กรัมต่อโมล) เกรดวิเคราะห์ ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี

6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide:NaOH มวลโมเลกุล 40.00 กรัมต่อโมล) เกรดวิเคราะห์ ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

7. ไดเมทธิลซัลฟอกซ์ไซด์ (Dimethylsulfoxide:C_2H_6OS มวลโมเลกุล 78.13 กรัมต่อโมล) เกรดสำหรับการสังเคราะห์ ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

8. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37 % (Hydrochloric acid:HCl มวลโมเลกุล 36.46 กรัมต่อโมล) เกรดวิเคราะห์ ของบริษัท RCI Labscan ประเทศไทย

9. เอทธิล อะซิเตท (Ethyl acetate:$C_4H_8O_2$ มวลโมเลกุล 88.11 กรัมต่อโมล) เกรดวิเคราะห์ ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารเคมี

1.1 สารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์

ชั่งสารมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 2.40 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายผสมเมทานอล: น้ำ อัตราส่วน 1:1.5 ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร (เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน)

1.2 สารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (DABA)

ชั่งแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 11.11, 4.44 และ 2.50 มิลลิกรัม ละลายด้วยไดเมทธิลซัลฟอกซ์ไซด์ ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร จะได้ DABA 6.00, 2.40 และ 1.35 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (เตรียมก่อนใช้) จากนั้นนำ DABA 6.00 มิลลิโมลาร์ ไปเจือจางด้วย ไดเมทธิลซัลฟอกซ์ไซด์ เป็นความเข้มข้นต่างๆ ตามต้องการ

1.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ นำไปเจือจางเป็นสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.10 โมลาร์ ปริมาตรตามที่ต้องการ

1.4 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก

ตวงกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37% ปริมาตร 4.2 มิลลิลิตร เทลงในน้ำปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.0 โมลาร์ นำไปเจือจางเป็นสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.10 โมลาร์ ปริมาตรตามที่ต้องการ

1.5 สารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

ชั่งโพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.6 มิลลิกรัม จำนวน 2 ชุด ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 8 มิลลิลิตรในบีกเกอร์ ปรับค่าพีเอชของสารละลายด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.10 โมลาร์ เพื่อให้ได้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 5 และ 6 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10 มิลลิโมลาร์ นำไปเจือจางเป็นสารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5, 1 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรตามที่ต้องการ

1.6 สารละลายบัฟเฟอร์ไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคะไฮเดรต 10 มิลลิโมลาร์

ชั่งไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคะไฮเดรต 35.8 มิลลิกรัม จำนวน 3 ชุด ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 8 มิลลิลิตรในบีกเกอร์ ปรับพีเอชของสารละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.10 โมลาร์ เพื่อให้ได้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7, 8 และปรับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.10 โมลาร์ เพื่อให้ได้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 9 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายบัฟเฟอร์ไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคะไฮเดรต 10 มิลลิโมลาร์ นำไปเจือจางเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคะไฮเดรต 5, 1และ 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรตามที่ต้องการ

1.7 สารละลายน้ำตาล 100 มิลลิโมลาร์

ชั่งน้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง และน้ำตาลอ้อย อย่างละ 0.6846 กรัม ลงในบีกเกอร์ใบที่ 1-3 ตามลำดับ จากนั้นละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 20 มิลลิลิตร

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนไลด์ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์

ปฏิกิริยาระหว่างบราสสิโนไลด์และแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด มีตัวแปรที่ศึกษาดังนี้ คือ ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น (Excitation wavelength, λ_{ex}) และความยาวคลื่นที่สารคายแสง (Emission wavelength, λ_{em}) ค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ อุณหภูมิ ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา และความเข้มข้นของสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด จากนั้นจึงนำสภาวะที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพและปุ๋ยน้ำ

2.1 ความยาวคลื่นที่ใช้ (λ_{ex} และ λ_{em})

ปิเปตสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์ มา 750 ไมโครลิตร และสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 2.4 มิลลิโมลาร์ มา 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 ลงไป 650 ไมโครลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปสแกนหา λ_{ex} และ λ_{em} ด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรโฟโตมิเตอร์ ใช้คิวเวตขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตั้งความกว้างแถบแสงของโมโนโครมาเตอร์ที่ใช้ในการกระตุ้น (excitation monochromator band witdh) เท่ากับ 10 นาโนเมตร และ ความกว้างแถบแสงของโมโนโครมาเตอร์ที่ใช้กับแสงที่คายออกมา (emission monochromator band witdh) เท่ากับ 5 นาโนเมตร เริ่มต้นการสแกนโดยตั้ง λ_{ex} ชั่วคราวไว้ที่ 220 นาโนเมตร แล้วสแกนสเปกตรัมการคายแสงของสารละลายตัวอย่าง จะทำให้ได้ λ_{em} ชั่วคราว จากนั้นใช้ λ_{em} ชั่วคราวที่หาได้ สแกนสเปกตรัมการ

กระตุ้นของสารละลายตัวอย่าง จะทำให้ทราบ λ_{ex} ของสารละลายตัวอย่างที่แท้จริง ใช้ λ_{ex} แท้จริงที่ได้ สแกนสเปกตรัมการคายแสงของสารละลายตัวอย่าง จะทำให้ทราบ λ_{em} ที่ถูกต้อง

2.2 ค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายผสมและทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1 โดยปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 5, 6, 7, 8 และ 9 อย่างละ 650 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 1-5 ตามลำดับ เขย่าสารละลายทุกหลอดให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ ที่ λ_{ex} 380 นาโนเมตร และ λ_{em} 505 นาโนเมตร

2.3 ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายผสมและทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1 โดยในหลอดที่ 1-4 ปรับปริมาตรสารละลายผสมด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในช่วงความเข้มข้น 0.1-10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และปรับปริมาตรสารละลายผสมด้วยน้ำปราศจากไอออน 650 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 5

2.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

เตรียมสารละลายผสมและทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่นำสารละลายผสมไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

2.5 ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

เตรียมสารละลายผสมและทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1 โดยตั้งสารละลายผสมให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 และ 70 นาที ตามลำดับ

2.6 ความเข้มข้นของสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด

เตรียมสารละลายผสมและทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่ปิเปตสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 0.15, 0.45, 0.75, 1.05, 1.35, 1.50, 2.40, 3.00, 4.50 และ 6.00มิลลิโมลาร์ มาอย่างละ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1-10 ตามลำดับ

3. การประเมินประสิทธิภาพของวิธี (Evaluation of method performance)

การประเมินประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับการหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ด้วยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมทรี โดยปัจจัยที่ต้องทำการศึกษา ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง กราฟมาตรฐาน ขีดจำกัดการตรวจวัด ขีดจำกัดการหาปริมาณ ความเที่ยง ผลของน้ำตาลต่อการรบกวนการวิเคราะห์ และค่าร้อยละการได้กลับคืน

3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์ มา 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 300, 450, 600, 750, 900 และ 1,200 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1-15 ตามลำดับ โดยในแต่ละหลอดมีสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 1.35 มิลลิโมลาร์ 100 ไมโครลิตรบรรจุอยู่ ปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดบอกปริมาตรที่ 1.5 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7 เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ ที่ λ_{ex} 380 นาโนเมตร และ λ_{em} 505 นาโนเมตร

3.2 กราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

เตรียมสารละลายผสมและทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.5.1 แต่ปิเปตสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์ มา 15, 75, 150, 300, 450, 600 และ 750 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1-7 ตามลำดับ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปทำการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ต่อไป

3.3 ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดการหาปริมาณ (Limit of quantification, LOQ)

ปิเปตสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 1.35 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7 ลงไป 1,400 ไมโครลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ ที่ λ_{ex} 380 นาโนเมตร และ λ_{em} 505 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่า LOD (3*SD/slope*) และ LOQ (10*SD/slope*)

3.4 ความเที่ยง (Precision)

- ความเที่ยงภายในวัน (Intra-day Precision)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์ มา 75, 150 และ 600 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1-3 ตามลำดับ โดยในแต่ละหลอดมีสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 1.35 มิลลิโมลาร์ 100 ไมโครลิตรบรรจุอยู่ ปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดบอกปริมาตรที่ 1.5 มิลลิลิตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7 เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ ที่ λ_{ex} 380 นาโนเมตร และ λ_{em} 505 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation หรือ % RSD)

- ความเที่ยงระหว่างวัน (Inter-day Precision)

เตรียมสารละลายผสมและทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ความเที่ยงภายในวัน โดยเตรียมสารสารละลายผสมใหม่และวิเคราะห์ทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation หรือ % RSD)

3.5 ผลของน้ำตาลต่อการรบกวนการวิเคราะห์

- ผลของน้ำตาลต่อการทำปฏิกิริยากับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด

ปิเปตสารละลายน้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง และน้ำตาลอ้อย 100 มิลลิโมลาร์ มาอย่างละ 15, 60, 100, 300, 600 และ 900 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1-6 ตามลำดับ โดยในแต่ละหลอดมีสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 1.35 มิลลิโมลาร์ 100 ไมโครลิตรบรรจุอยู่ จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดบอกปริมาตรที่ 1.5 มิลลิลิตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชเท่ากับ 7 เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ ที่ λ_{ex} 380 นาโนเมตร และ λ_{em} 505 นาโนเมตร

- ผลของน้ำตาลต่อการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ของบราสสิโนสเตียรอยด์

ปิเปตสารละลายน้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง และน้ำตาลอ้อย 100 มิลลิโมลาร์ มาอย่างละ 600 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1-3 ตามลำดับ จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์ 150 ไมโครลิตร และสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 1.35 มิลลิโมลาร์ 100 ไมโครลิตร ใส่ตามลงไปทุกหลอด สุดท้ายปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดบอกปริมาตรที่ 1.5 มิลลิลิตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชเท่ากับ 7 เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ ที่ λ_{ex} 380 นาโนเมตร และ λ_{em} 505 นาโนเมตร

3.6 การหาค่าร้อยละการได้กลับคืน (% Recovery)

ทำการทดสอบโดยการหาค่าร้อยละการกลับคืนในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ และตัวอย่างปุ๋ยน้ำ โดยทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 22 ตัวอย่าง จำแนกเป็นตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ 18 ตัวอย่าง และตัวอย่างปุ๋ยน้ำ 4 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ความเข้มข้น ดังนี้

- ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ

กรองตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และปิเปตมา 200-700 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับสีและความเข้มข้นของตัวอย่าง หรือนำตัวอย่างที่กรองแล้วไปเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนในอัตราส่วน 1:2-1:10 ก่อนที่จะปิเปตมาทำปฏิกิริยา จากนั้นปิเปตสารละลาย

มาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์ ที่ 4 ระดับความเข้มข้นระหว่าง 0-4 เท่าของความเข้มข้นของบราสสิโนไลด์ที่มีอยู่ในตัวอย่างเริ่มต้น และปิเปตสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 1.35 มิลลิโมลาร์ มา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดบอกปริมาตรที่ 1.5 มิลลิลิตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชเท่ากับ 7 เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ ที่ λ_{ex} 380 นาโนเมตร และ λ_{em} 505 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนไลด์ (% Recovery)

- ***ตัวอย่างปุ๋ยน้ำ***

ปิเปตตัวอย่างปุ๋ยน้ำ หรือปุ๋ยน้ำที่เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนในอัตราส่วน 1:40 หรือ 1:100 มา 20-400 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับสีและความเข้มข้นของตัวอย่าง ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปิเปตสารละลายและทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ

4. การวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์ในตัวอย่างด้วยวิธี Standard Addition

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองการหาค่าร้อยละการได้กลับคืนมาคำนวณหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไรด์ ในตัวอย่างต่าง ๆ ด้วยวิธี Standard Addition โดยการสร้างกราฟระหว่างค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไรด์ที่เติม จากนั้น แทนค่า y = 0 ลงในสมการเส้นตรงของกราฟที่ได้แล้วหาค่า x ก็จะทำให้ทราบปริมาณของฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไรด์ ในตัวอย่างได้

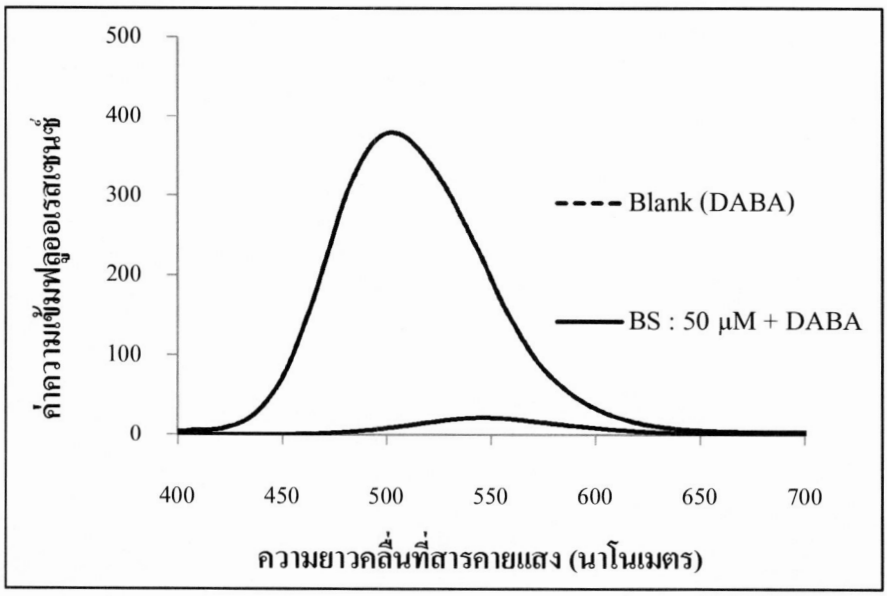
บทที่ 4
ผลและอภิปรายการวิจัย

1. สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนไลด์ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ในน้ำหมักชีวภาพและปุ๋ยน้ำ ด้วยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมทรี โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างบราสสิโนไลด์กับรีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ ผลการศึกษามีสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา การประเมินประสิทธิภาพของวิธี และการวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์ในตัวอย่างด้วยวิธี Standard Addition

1.1. ความยาวคลื่นที่ใช้ (λ_{ex} และ λ_{em})

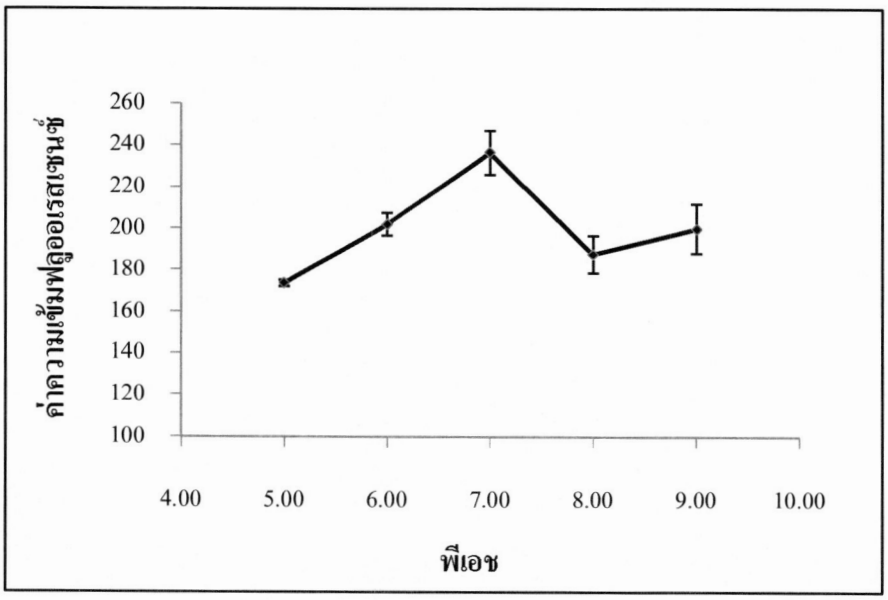
เมื่อนำสารละลายผสมของสารมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 50 ไมโครโมลาร์ กับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 160 ไมโครโมลาร์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ไปสแกนหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมด้วยคิวเวตขนาด 1.5 มิลลิลิตร พบว่าเมื่อความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น (λ_{ex}) เท่ากับ 380 นาโนเมตร จะได้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร (λ_{em}) ดังรูปที่ 4.1 ความยาวคลื่นทั้งสองนี้ถูกนำไปใช้ตลอดการวิเคราะห์ โดยโมโนโครมาเตอร์ที่ใช้ในการกระตุ้นใช้แถบแสงกว้าง 10 นาโนเมตร ส่วนโมโนโครมาเตอร์ที่แสงคายออกมาใช้แถบแสงกว้าง 5 นาโนเมตร ค่าการขยายสัญญาณ



รูปที่ 4.1 ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาอนุพันธ์

1.2 พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์

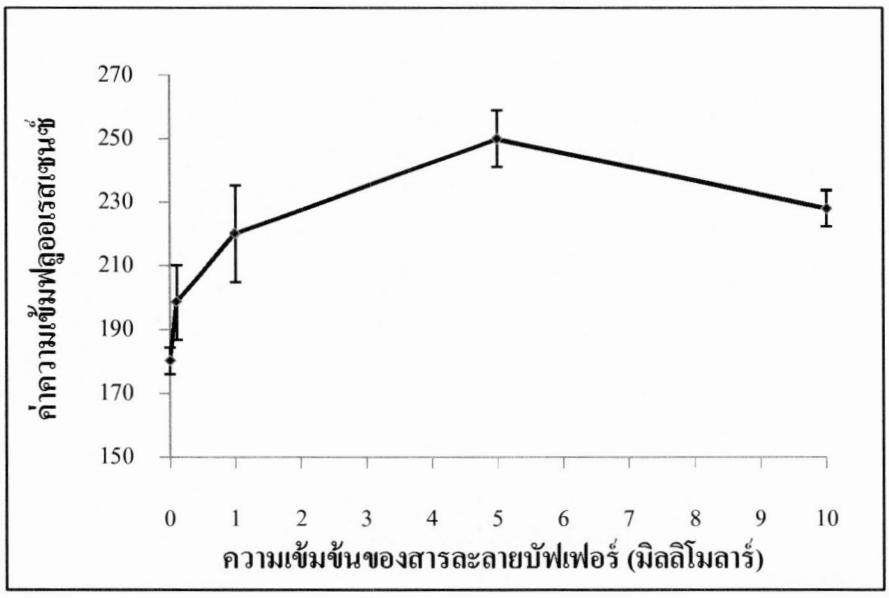
เมื่อใช้สารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 50 ไมโครโมลาร์ ผสมกับสารละลาย แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 0.16 มิลลิโมลาร์ ปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆกัน ในช่วงพีเอช 5-9 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ผลการทดลองดังรูปที่ 4.2 พบว่าค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม คือ 7 เนื่องจากเมื่อบัฟเฟอร์มีค่าพีเอชต่ำกว่าหรือสูงกว่า 7 จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแดนซิลอะมิโนเฟนิล บอโรนิค แอซิด กล่าวคือ ในกรณีที่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีค่าพีเอชต่ำกว่า 7 โปรตอนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการโปรโตเนตที่อะตอมไนโตรเจน หรืออะตอมออกซิเจนในโครงสร้างของแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ทำให้จำนวนอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวในโมเลกุลลดลง ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์จึงมีค่าลดลงไปด้วย และในกรณีที่สารละลายบัฟเฟอร์มีค่าพีเอชสูงกว่า 7 โปรตอนที่หมู่ซัลโฟนาไมด์ และหมู่ไฮดรอกซิลของ แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิดจะถูกดึงออกไป (Deprotonated) ทำให้โมเลกุลมีประจุลบ มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวเพิ่มขึ้น เกิดเรโซแนนซ์ได้ง่าย พลังงานที่คายออกมาอาจมีค่าน้อยลง ซึ่งส่งผลให้พีคของสารผลิตภัณฑ์เกิดที่ความยาวคลื่นที่ยาวขึ้น และทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร มีค่าลดลง



รูปที่ 4.2 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่พีเอชต่างกัน

1.3 ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์

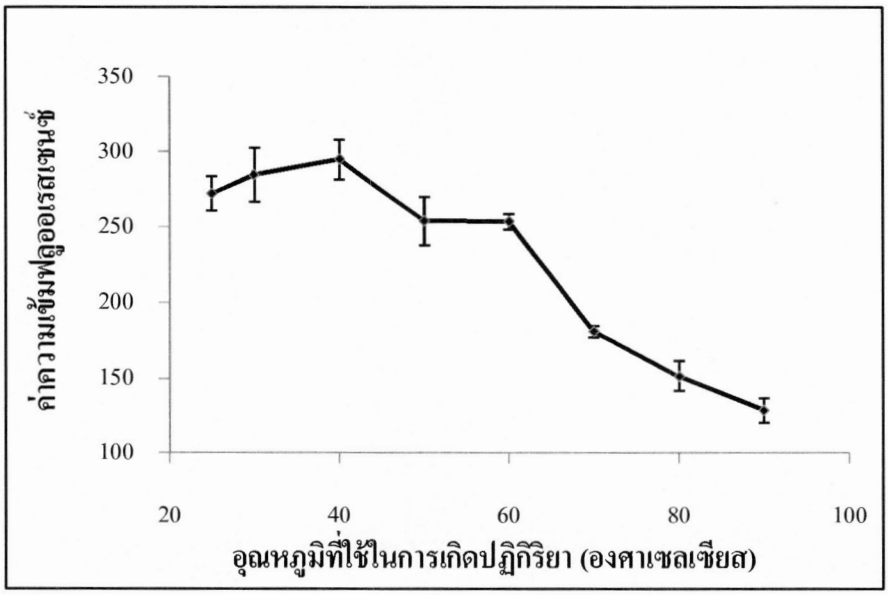
ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ มีผลต่อค่า ionic strength และค่า pK_a ของกรดที่ใช้เตรียมบัฟเฟอร์ ที่จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ที่เตรียม ถึงแม้ว่าอัตราส่วนความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์จะมีค่าคงที่ก็ตาม (Perrin, D. D., and Dempsey, B., 1974) งานวิจัยจึงได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ โดยใช้สารละลายโพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ผสมกับสารละลายไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคะไฮเดรต เตรียมบัฟเฟอร์พีเอช 7 เข้มข้นระหว่าง 0.1-10 มิลลิโมลาร์ เป็นสารละลายปรับปริมาตร โดยผสมสารละลายมาตรฐาน บราสสิโนไลด์ 50 ไมโครโมลาร์กับสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 160 ไมโครโมลาร์ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ผลแสดงดังรูปที่ 4.3 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ก็มีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงที่ 5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์เริ่มลดลง ซึ่งอาจจะเป็นผลของ Ionic strength ดังที่กล่าวมาแล้วหรือ เป็นผลจากฟอสเฟตไอออนที่เป็น Quencher ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีปริมาณมากเกินพอ ซึ่งทำให้เกิด Fluorescence quenching ขึ้นได้ ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารละลายปรับปริมาตรคือ 5 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 4.3 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ต่างกัน

1.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

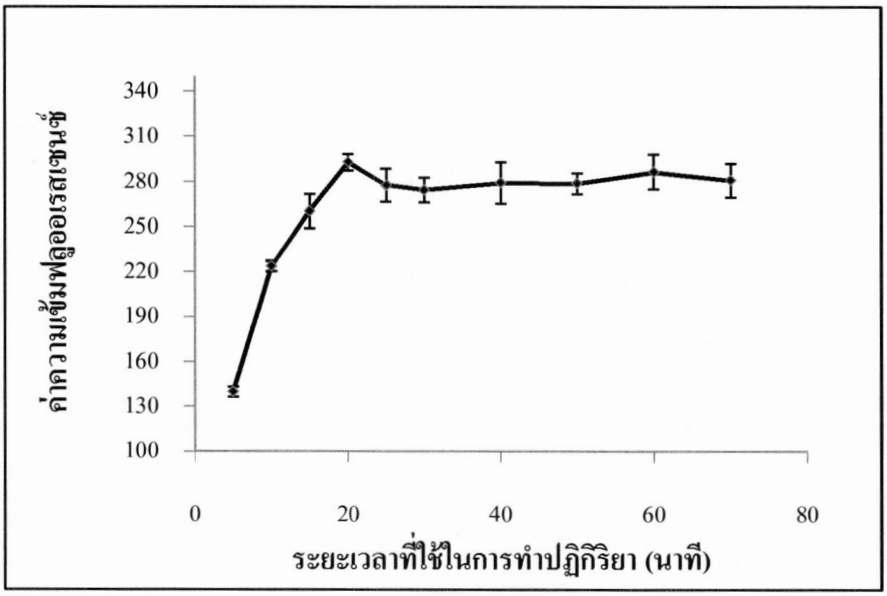
อุณหภูมิมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ในเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ กล่าวคือ กล่าวคือ อุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นจะเกิดกระบวนการไม่แผ่รังสี (Non-radiative processes) ทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ลดลง (Valeur, B., 2001) โดยมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ ใช้การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่างบราสสิโนสเตียรอยด์กับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ที่ 70 องศาเซลเซียส (Gamoh, K., Okamoto, N., Takatsuto, S., and Tejima, I., 1990) นอกจากนั้นยังมีงานวิจัยที่ใช้อุณหภูมิห้อง สำหรับการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่างแซคคาไรด์ กับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (Luis, G. P., Granda, M., Badia, R., and Diaz-Garcia, M. E., 1998; Peng, B., and Qin, Y., 2008; Seckin, Z. E., 2004) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาอุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา โดยใช้สารละลายมาตรฐาน บราสสิโนไลด์ 50 ไมโครโมลาร์ ผสมกับสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 160 ไมโครโมลาร์ และใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 7 เป็นสารละลายปรับปริมาตร ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิต่างๆกัน ในช่วง 25-90 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4 พบว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่างบราสสิโนไลด์และแดนซิลอะมิโนเฟนิล บอโรนิค แอซิด เพื่อความสะดวกและง่ายต่อการทำอนุพันธ์ โดยการเพิ่มอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่สูงกว่า 40 องศาเซลเซียส จะส่งผลให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ลดลง ตามลำดับ



รูปที่ 4.4 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างกัน

1.5 ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

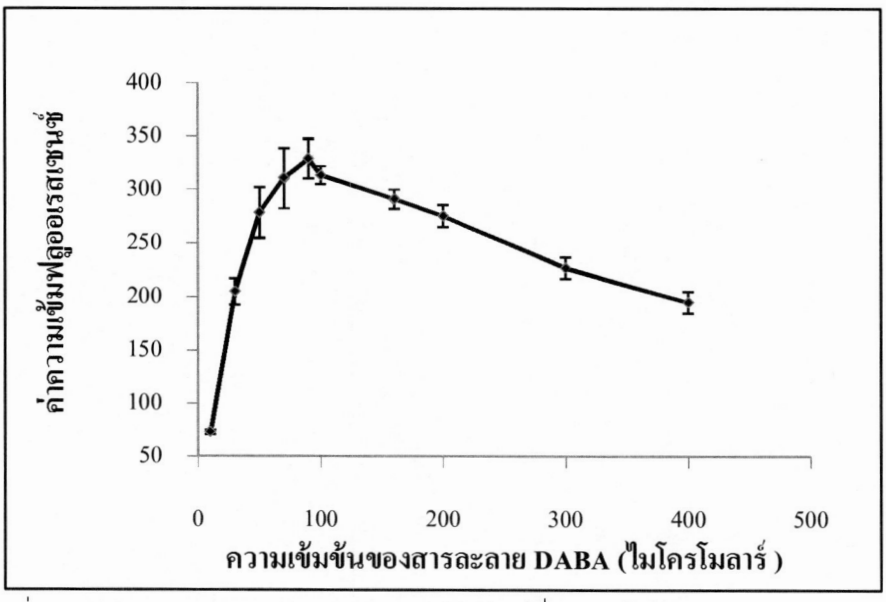
เมื่อนำสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 50 ไมโครโมลาร์ และสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 160 ไมโครโมลาร์ ปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 7 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในช่วงระยะเวลา 5-70 นาที ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.5 พบว่าหลังจากเวลาผ่านไป 20 นาที การตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่สูงสุด และจะมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 25 นาที จากนั้นค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลงจะมีค่าคงที่ไปเรื่อยๆ ถึงแม้ว่าจะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานถึง 70 นาทีก็ตาม จึงกล่าวได้ว่าสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำอนุพันธ์มีความเสถียรที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน ดังนั้นเวลาที่ 20 นาที จึงมีความเหมาะสมที่จะเลือกใช้ในการทำปฏิกิริยา เนื่องจากให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สูงสุด ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่ได้ทำการหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับรีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีเช่นเดียวกัน (Takatsuto, S., Omote, K., Gamoh, K., and Ishibashi, M., 1990; Winter, J., Schneider, B., Meyenburg, S., Strack, D., and Adam, G., 1999



รูปที่ 4.5 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อทำปฏิกิริยาที่ระยะเวลาต่างกัน

1.6 ความเข้มข้นของสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด

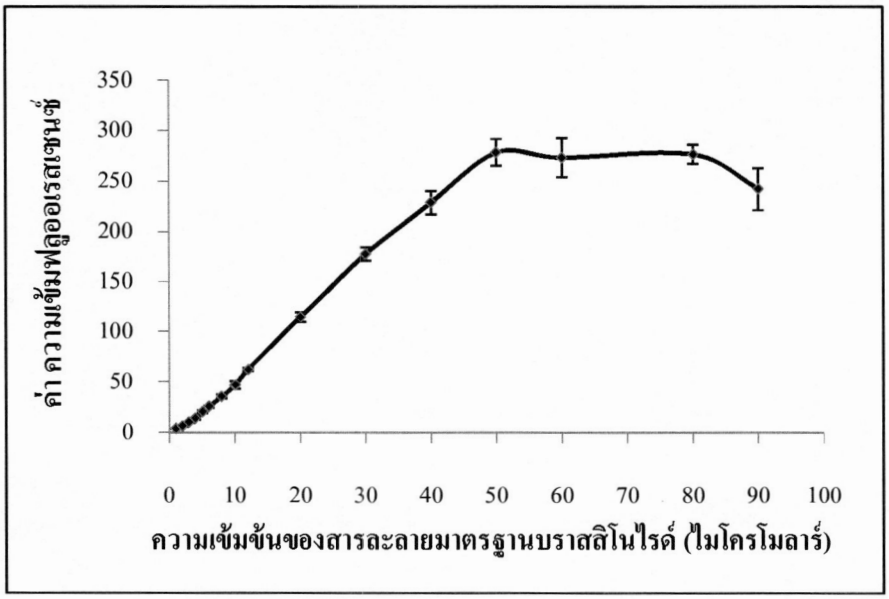
เมื่อนำสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 50 ไมโครโมลาร์ ทำปฏิกิริยากับสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ในช่วงความเข้มข้น 10-400 ไมโครโมลาร์ ปรับปริมาตรสารละลายผสมด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที ผลแสดงดังรูปที่ 4.6 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของรีเอเจนต์มากขึ้นจะทำให้มีค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์มีค่าเพิ่มขึ้นตามไปด้วยจนถึงที่ 90 ไมโครโมลาร์ จากนั้นก็จะมีค่าลดลงเรื่อยๆ อันเนื่องมาจากเมื่อใช้รีเอเจนต์ในการทำอนุพันธ์ในปริมาณที่มากเกินไป โมเลกุลของรีเอเจนต์ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาอยู่จะชนกันเองหรือชนกับโมเลกุลผลิตภัณฑ์ เกิดปรากฏการณ์ fluorescence quenching ขึ้น ทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์มีค่าลดลง ดังนั้นค่าความเข้มข้นของสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ที่ 90 ไมโครโมลาร์ จึงถูกเลือก ใช้ในการทำอนุพันธ์กับบราสสิโนไลด์ต่อไป



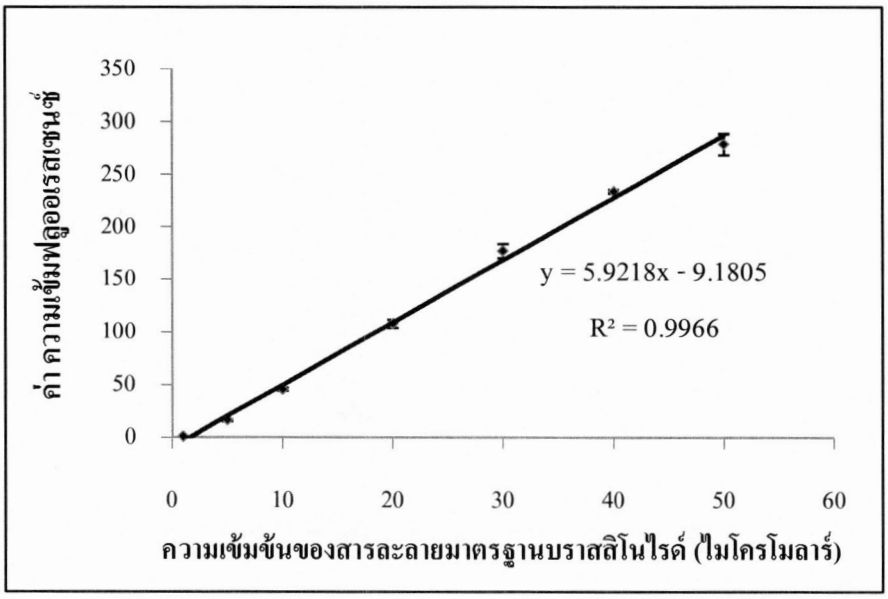
รูปที่ 4.6 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ความเข้มข้นของสารละลายแดนซิอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิดต่างกัน

2. การประเมินประสิทธิภาพของวิธี (Evaluation of method performance)

วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) อยู่ระหว่าง 1-50 ไมโครโมลาร์ ดังรูปที่ 4.7 เมื่อความเข้มข้นของบราสสิโนไลด์สูงขึ้น ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์จะมีค่าคงที่ จึงได้นำช่วงความเป็นเส้นตรงนี้มาสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) แสดงดังรูปที่ 4.8 ซึ่งกราฟมาตรฐานของบราสสิโนไลด์ มีสมการเส้นตรง คือ $y = 5.9218x-9.1805$ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9966 ค่าที่ได้เข้าใกล้ 1 แสดงถึงแนวโน้มที่ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานบราสสิโนไลด์และค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์มีความเป็นเส้นตรงอย่างดี



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์



รูปที่ 4.8 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์

ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD, 3*SD/slope*, n = 10) มีค่าเท่ากับ 38 นาโนโมลาร์ และค่าขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ, 10*SD/slope*, n = 10) มีค่าเท่ากับ 127 นาโนโมลาร์ แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ได้ในระดับนาโนโมลาร์

ผลการศึกษาความเที่ยงภายในวัน (Intra-day Precision) และความเที่ยงระหว่างวัน (Inter-day Precision) โดยนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation หรือ % RSD) ผลดังตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าวิธีการนี้มีความเที่ยงตรงอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ตามมาตรฐานของ Association of Official Analytical Chemists International (1993) ซึ่งค่าที่ได้ต้องไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงความเข้มข้นระดับไมโครโมลาร์หรือมิลลิกรัมต่อลิตร

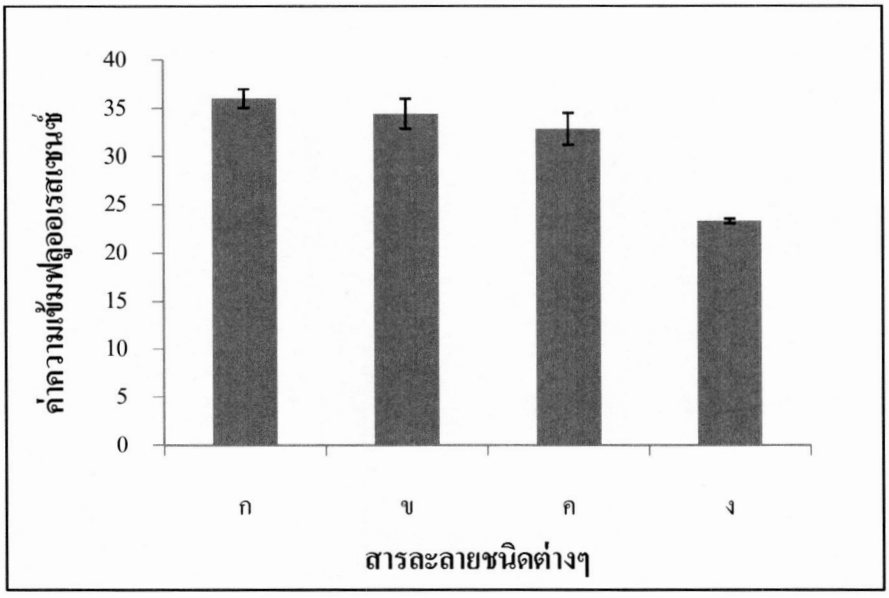
ตารางที่ 4.1 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการศึกษาความเที่ยง (n=7)

ความเที่ยง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD)		
	ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์)		
	5	10	40
ภายในวัน	6.55	2.00	2.47
ระหว่างวัน	8.42	7.08	7.71

- ผลของน้ำตาลต่อปฏิกิริยาอนุพันธ์

ในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพและการผลิตปุ๋ยน้ำต้องใช้น้ำตาลเป็นส่วนประกอบ น้ำตาลที่ใช้เป็นน้ำตาลซูโครส ซึ่งตามสูตรเคมี โมเลกุลของซูโครสจะมีหมู่ไดออล (Vicinal diols) ที่อาจเกิดปฏิกิริยากับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิดที่ เป็นฟลูออโรฟอร์ได้ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาสมมติฐานนี้ โดยศึกษาน้ำตาล 3 ชนิดที่ใช้ในตัวอย่าง คือ น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง และน้ำตาลอ้อย ที่ความเข้มข้น 1- 60 มิลลิโมลาร์ เมื่อนำน้ำตาลแต่ละชนิดมาทำปฏิกิริยากับสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 90 ไมโครโมลาร์ พบว่าไม่มีสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่างแซคคาไรด์กับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (Luis, G. P., Granda, M., Badia, R., and Diaz-Garcia, M. E., 1998) ได้รายงานว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ผลิตภัณฑ์ที่ลดสัญญาณฟลูเรสเซนส์ (Fluorescence quenching) และเกิดได้ดีกับเฉพาะน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวฟรุกโตส แต่จากปริมาณน้ำตาลที่ค่อนข้างสูงในตัวอย่าง งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาต่อถึงผลของน้ำตาลต่อการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ของบราสสิโนไลด์ โดยใช้น้ำตาลแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ (เป็นปริมาณน้ำตาลโดยประมาณที่พบในตัวอย่างที่เจือจางก่อนนำมาวิเคราะห์) มาทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 10 ไมโครโมลาร์ และสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 90 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองแสดง

ดังรูปที่ 4.9 พบว่าค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายผสมน้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายแดง มีค่าลดลงเล็กน้อย แต่ในน้ำตาลอ้อย ค่าฟลูออเรสเซนซ์ลดลงมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับค่าฟลูออเรสเซนซ์ของบราสสิโนไลด์ที่ไม่มีการเติมน้ำตาลลงไป อาจเนื่องมาจากสีของน้ำตาลอ้อยมีความเข้มกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ จึงบดบังการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ได้มาก แต่ในการทดลองนี้สารตัวอย่างมีปริมาณบราสสิโนไลด์สูงพอ จึงสามารถแก้ไขปัญหานี้โดยการเจือจางสารตัวอย่างด้วยน้ำปราศจากไอออนที่อัตราส่วนต่าง ๆ ก่อนที่จะปิเปตต์มาทำปฏิกิริยา เพื่อลดความเข้มของสีจากสารตัวอย่างที่รบกวนการวิเคราะห์



รูปที่ 4.9 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์เมื่อผสมด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆกับบราสสิโนไลด์ 10 ไมโครโมลาร์ โดย ก: บราสสิโนไลด์ อย่างเดียว ข: บราสสิโนไลด์+น้ำตาลทรายขาว ค: บราสสิโนไลด์+น้ำตาลทรายแดง ง: บราสสิโนไลด์+น้ำตาลอ้อย

ผลการศึกษาค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพและปุ๋ยน้ำ แสดงดังตารางที่ 4.2 และ 4.3 พบว่าค่าร้อยละการได้กลับคืนมีค่าอยู่ในช่วง 5.0-52.5 เปอร์เซ็นต์ และ 10.0-51.7 เปอร์เซ็นต์ ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพและปุ๋ยน้ำ ตามลำดับ ซึ่งค่าร้อยละการได้กลับคืนของ บราสสิโนไลด์ในตัวอย่างมีค่าค่อนข้างต่ำ และมีการกระจายตัวสูง ในการทดลองได้เพิ่มความเข้มข้นของรีเอเจนต์สำหรับการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์แล้ว แต่ผลการทดลองที่ได้ก็ไม่ต่างกัน จึงไม่ใช่ปัญหาว่ารีเอเจนต์ไม่พอทำปฏิกิริยา แต่อาจเป็นไปได้มากกว่าว่าในตัวอย่าง มีเมทริกซ์ที่รบกวนการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ทำให้ปริมาณที่วิเคราะห์ได้น้อยกว่าที่มีอยู่จริงในตัวอย่าง การวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์ใน

ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพและปุ๋ยน้ำ จึงเลือกใช้วิธี Standard Addition เพื่อแก้ปัญหาการรบกวนจากเมทริกซ์ รายละเอียดดังในหัวข้อต่อไป

ตารางที่ 4.2 ค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ (n = 3)

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของบราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์)			ค่าร้อยละ
น้ำหมักชีวภาพ	ก่อนเติม	ที่เติมลงไป	หลังเติม	การได้กลับคืน
สาหร่าย	1.8	0.0	-	-
		2.0	1.9	5.0
		4.0	2.0	5.0
		8.0	2.4	7.5
กล้วยน้ำว้า	1.9	0.0	-	-
		2.0	2.0	5.0
		4.0	2.5	15.0
		8.0	3.4	18.8
บอระเพ็ด	1.6	0.0	-	-
		1.5	1.7	6.7
		3.0	1.9	10.0
		6.0	2.4	13.3
กระชาย	1.7	0.0	-	-
		1.5	1.8	6.7
		3.0	2.0	10.0
		6.0	2.4	11.7
โหระพา	1.8	0.0	-	-
		1.0	1.9	10.0
		2.0	2.1	15.0
		4.0	2.9	27.5
ข้าว	1.8	0.0	-	-
		2.0	2.0	10.0
		4.0	2.4	15.0
		8.0	3.0	15.0

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของบราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์)			ค่าร้อยละ
น้ำหมักชีวภาพ	ก่อนเติม	ที่เติมลงไป	หลังเติม	การได้กลับคืน
มะเขือเทศ	2.2	0.0	-	-
		1.5	2.4	13.3
		3.0	2.7	16.7
		6.0	3.5	21.7
แก้วมังกร	2.4	0.0	-	-
		2.0	2.6	10.0
		4.0	3.0	15.0
		8.0	3.7	16.2
ย่านาง	2.1	0.0	-	-
		1.0	2.2	10.0
		2.0	2.4	15.0
		4.0	3.2	27.5
ใบเตย	1.8	0.0	-	-
		1.0	2.0	20.0
		2.0	2.2	20.0
		4.0	3.1	32.5
ข่า	2.0	0.0	-	-
		2.0	2.4	20.0
		4.0	2.9	22.5
		8.0	4.3	28.8
ขิง	1.8	0.0	-	-
		1.0	2.0	20.0
		2.0	2.3	25.0
		4.0	3.3	37.5

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ตัวอย่าง น้ำหมักชีวภาพ	ความเข้มข้นของบราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์)			ค่าร้อยละ การได้กลับคืน
	ก่อนเติม	ที่เติมลงไป	หลังเติม	
ขมิ้น	2.3	0.0	-	-
		1.5	2.6	20.0
		3.0	3.2	30.0
		6.0	4.4	35.0
เงาะ	2.2	0.0	-	-
		1.0	2.4	20.0
		2.0	2.8	30.0
		4.0	3.8	40.0
มะยม	2.4	0.0	-	-
		1.5	2.8	26.7
		3.0	3.5	36.7
		6.0	5.0	43.3
ผลไม้รวม	2.1	0.0	-	-
		3.0	2.9	26.7
		6.0	3.9	30.0
		12.0	5.4	27.5
ลองกอง	3.6	0.0	-	-
		2.0	4.4	40.0
		4.0	5.5	47.5
		8.0	7.8	52.5
มะกรูด	1.5	0.0	-	-
		1.5	2.1	40.0
		3.0	2.5	33.3
		6.0	3.0	25.0

ตารางที่ 4.3 ค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างปุ๋ยน้ำชนิดต่างๆ (n=3)

ตัวอย่างปุ๋ยน้ำ	ความเข้มข้นของบราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์)			ค่าร้อยละ
	ก่อนเติม	ที่เติมลงไป	หลังเติม	การได้กลับคืน
ก	2.2	0.0	-	-
		2.0	2.4	10.0
		4 .0	2.8	15.0
		8.0	4.1	23.8
ข	3.6	0.0	-	-
		4.0	4.0	10.0
		8.0	5.2	20.0
		16.0	9.2	35.0
ค	3.1	0.0	-	-
		1.5	3.3	13.3
		3.0	3.9	26.7
		6.0	6.2	51.7
ง	3.1	0.0	-	-
		1.5	3.3	13.3
		3.0	4.1	33.3
		6.0	6.2	51.7

3. ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์ในตัวอย่างด้วยวิธี Standard Addition

การวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโน สเตียรอยด์ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพและปุ๋ยน้ำด้วยวิธี Standard Addition ทั้งหมด 22 ตัวอย่าง เป็นน้ำหมักชีวภาพ 18 ตัวอย่าง และตัวอย่างปุ๋ยน้ำ 4 ตัวอย่าง โดยการทดลองทำวิธีเดียวกับการหาค่าร้อยละการได้กลับคืน จึงได้ใช้ผลข้อมูลจากการทดลองเดียวกัน มาคำนวณปริมาณด้วยวิธี Standard Addition ผลแสดงดังตารางที่ 4.4 และ 4.5 พบว่าในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพทั้ง 18 ตัวอย่าง มีปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์อยู่ในช่วง 5.8-244.4 ไมโครโมลาร์ (2.8-117.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และในตัวอย่างปุ๋ยน้ำทั้ง 4 ตัวอย่าง มีค่าอยู่ในช่วง 378-1669 ไมโครโมลาร์ (168-846 มิลลิกรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.4 ปริมาณบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพทั้ง 18 ชนิด (n=3)

ตัวอย่าง น้ำหมักชีวภาพ	ปริมาณบราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์)	ตัวอย่าง น้ำหมักชีวภาพ	ปริมาณบราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์)
ผลไม้รวม	11.8 ± 1.5	ย่านาง	39.6 ± 2.2
โหระพา	6.2 ± 0.4	กล้วยน้ำว้า	30.4 ± 4.7
ขมิ้น	5.8 ± 0.2	กระชาย	54.6 ± 7.2
ลองกอง	9.2 ± 0.3	ข่า	77.4 ± 4.1
ขิง	19.0 ± 0.8	มะเขือเทศ	40.1 ± 1.5
มะยม	9.8 ± 0.4	ข้าว	133.7 ± 8.2
ใบเตย	15.8 ± 2.3	บอระเพ็ด	244.4 ± 17.8
มะกรูด	57.9 ± 8.4	แก้วมังกร	120.1 ± 13.5
เงาะ	25.0 ± 1.7	สาหร่าย	212.2 ± 13.8

ตารางที่ 4.5 ปริมาณบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างปุ๋ยน้ำทั้ง 4 ชนิด (n=3)

ตัวอย่างปุ๋ยน้ำ	ปริมาณบราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์)
ก	1,669 ± 81
ข	378 ± 36
ค	1,060 ± 17
ง	1,115 ± 8

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ พบว่าตัวอย่าง น้ำหมักชีวภาพข้าว บอระเพ็ด แก้วมังกร และสาหร่าย มีปริมาณของฮอร์โมนพืชกลุ่ม บราสสิโนสเตียรอยด์ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์อยู่ในปริมาณสูงกว่าตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพจากพืชชนิดอื่นๆ และในตัวอย่างปุ๋ยน้ำ ก ค และ ง มีปริมาณของฮอร์โมนพืชกลุ่ม บราสสิโนสเตียรอยด์ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์อยู่ในปริมาณสูงกว่าตัวอย่างปุ๋ยน้ำ ข

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพและปุ๋ยน้ำ ด้วยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมทรี โดยการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่างบราสสิโนไลด์ กับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ด้วยวิธี Standard Addition วิธีวิเคราะห์นี้สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว ลดระยะเวลา และขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างเพียงแค่ใช้การเจือจางสารตัวอย่างด้วยน้ำปราศจากไอออนเท่านั้นก่อนที่จะนำไปทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับฟลูออโรฟอร์รีเอเจนต์ และใช้ปริมาตรสารทั้งหมดในระดับไมโครสเกล ต้นทุนการวิเคราะห์จะประหยัดกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิคโครมาโตกราฟี ของเสียก็มีปริมาณน้อยกว่า จัดเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

โดยวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้นำไปประยุกต์ใช้สำหรับหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์รวมได้ และทำการวิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่หลากหลาย รวมทั้งสามารถนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ไปใช้ประกอบการเลือกวัตถุดิบ เพื่อใช้สำหรับการทำน้ำหมักชีวภาพได้ เช่น ข้าวบอระเพ็ด แก้วมังกร สาหร่าย เป็นต้น เนื่องจากพืชเหล่านี้เมื่อนำมาทำเป็นน้ำหมักชีวภาพแล้ว จะมีปริมาณของฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ที่สูง ใช้ในการเพิ่มหรือเร่งการเจริญเติบโตของพืชได้ดี

บรรณานุกรม

ชรัสนันท์ ตาชม. (2548). *ผลของบราสิโนสเตียรอยด์ จิบเบอเรลลิน และออกซินต่อการเจริญเติบโตของผลลำไย*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์), สาขาวิชาพืชสวน, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ณัฐพงศ์ สัตยพานิช. (2552). *ผลของบราสิโนสเตียรอยด์ต่อการเปลี่ยนแปลงเอทิลีนและสารชีวเคมีในลำไยพันธุ์ดอ*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์), สาขาวิชาพืชสวน, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นพดล จรัสสัมฤทธิ์. (2537). *ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช*. กรุงเทพฯ: สหมิตรออฟเซท.

พีรเดช ทองอำไพ. (2537). *ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ: วิชัยการพิมพ์.

มุกดา สุขสวัสดิ์. (2545). *ชุดคู่มือการเกษตร "ปุ๋ยอินทรีย์"*. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน.

เยาวพา จิระเกียรติกุล และ นฤมล วชิรปัทมา. (2551). ผลของน้ำสกัดชีวภาพต่อการเจริญเติบโตของดาวเรืองฝรั่งเศส. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์*, *16*(2), 68-75.

อานัฐ ตันโช. (2555). ฮอร์โมนพืชในน้ำหมักจากพืชและสัตว์. *เกษตรกรรมธรรมชาติ*, *15*(2), 28-33.

Adam, G., and Marquardt, V. (1986). Review Article Number 19 : Brassinosteroids. *Phytochemistry*, *25*(8), 1787-1799.

Association of Official Analytical Chemists International. (1993). *AOAC Peer-verified MethodsPolicies and Procedures*. United state of America.

Bajguz, A., and Tretyn, A. (2003). The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry*, *62*, 1027-1046.

Borisevich, N. A., Raichenok, T. F., Khripach, V. A., Zhabinskii, V. N., and Ivanova, G. V. (2008). Solution electronic spectra of brassinosteroid and a synthesized conjugate of a steroid and a fluorescence label. *Journal of Applied Spectroscopy*, *75*(1), 75-79.

Bulut, M. (2006). *Immobilization studies utilizing solid supports for the determination of fructose by dansylaminophenyl boronic acid (DAPB acid) and chromate by diphenylcarbazide(DPC).* Master's thesis, Department of Chemistry, The Middle East TechnicalUniversity.

Clouse, S. D. (2004). Regulators of Growth : Brassinosteroids. In *Encyclopedia of*

Applied Plant Sciences . 1026-1035. Amsterdam: Elsevier, The Netherlands.

Crespo-Otero, R., Suardiaz, R., Pina-Luis, G., Valdes, M. G., Diaz-Garcia, M. E.et al. (2008). Theoretical study of *m*-dansylaminophenylboronic acid and their species: A sugarchemosensor. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 852*, 71–77.

Gamoh, K., Omote, K., Okamoto, N., and Takatsuto, S. (1989). High-performance liquid chromatography of brassinosteroids in plants with derivatization using 9-phenanthreneboronic acid. *Journal of Chromatography A, 469*, 424-428.

Gamoh, K., and Takatsuto, S. (1989). A boronic acid derivative as a highly sensitive fluorescence derivatization reagent for brassinosteroids in liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta, 222*, 201-204.

Gamoh, K., Okamoto, N., Takatsuto, S., and Tejima, I. (1990). Determination of traces of natural brassinosteroids as dansylaminophenylboronates by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Analytica Chimica Acta, 228*, 101-106.

Guilbault, G. G. (1990). *Practical fluorescence*. New York: Marcel Dekker : United States of America.

Hooley, R. (1996). Plant steroid hormones emerge from the dark. *TIG, 12*(8), 1-3.

Huo, F., Wang, X., Han, Y., Bai, Y., Zhang, W. Yuan, H., and Liu, H. (2012). A new derivatization approach for the rapid and sensitive analysis of brassinosteroids by using ultra high performance liquid chromatography-electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta, 99*, 420-425.

Luis, G. P., Granda, M., Badia, R., and Diaz-Garcia, M. E. (1998). Selective fluorescent chemosensor for fructose. *Analyst, 123*, 155–158.

Mitchell, J. W., Mandava, N. B., Worley, J. F., Plimmer, J. R., and Smith, M. V. (1970). Brassins – a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature, 225*, 1065-1066.

Pachthong, C., Supyen, D., Buddhasukh, D., and Jatisatienr, A. (2006). Isolation and Characterization of Brassinolide and Castasterone in the Pollen of Pumpkin. *Chiang Mai Journal of Science, 33*(1), 95-101.

Peng, B., and Qin, Y. (2008). Lipophilic Polymer Membrane Optical Sensor with a Synthetic Receptor for Saccharide Detection. *Analytical Chemistry, 80*(15), 6137–6141.

Perrin, D. D., and Dempsey, B. (1974). *Buffers for pH and Metal Ion Control*. London. Chapman and Hall Ltd p 6-7,117.

Seckin, Z. E. (2004). *Fluorescence determination of monosaccharides and catecholamines by using dansylaminophenyl boronic acid.* Master's thesis, Department of Chemistry, The Middle East Technical University.

Srivastava, L. M. (2002). Chapter 9 : Brassinosteroids. In *Plant Growth and Development: Hormones and Environment* (205-215). Academic Press : Elsevier Science, United States of America.

Takatsuto, S., Omote, K., Gamoh, K., and Ishibashi, M. (1990). Identification of Brassinolide and Castasterone in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Pollen. *Agricultural Biology and Chemistry*, *54*(3), 757-762.

Takatsuto, S. (1994). Brassinosteroids: distribution in plants, bioassays and microanalysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *658*, 3-15.

Valeur, B. (2001). *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH.

Winter, J., Schneider, B., Meyenburg, S., Strack, D., and Adam, G. (1999). Monitoring brassinosteroid biosynthetic enzymes by fluorescent tagging and HPLC analysis of their substrates and products. *Phytochemistry*, *51*, 237-242.

Zullo, M. A. T., and Adam, G. (2002). Brassinosteroid phytohormones - structure, bioactivity and applications. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *14*(3), 143-181.

_____. (2555). *Reagents for Modifying Alcohols—Section 3.2*. วันที่ค้นข้อมูล 15 กันยายน 2555, เข้าถึงได้จาก http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Reagents-for-Modifying-Groups-Other-Than-Thiols-or-Amines/Reagents-for-Modifying-Alcohols.html