สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

การหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ในน้ำหมักชีวภาพ

กนกพร จินดาพรรณ

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

28 พ.ค. 2557
337472

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
มีนาคม 2557

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ กนกพร จินดาพรรณ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นภา ตั้งเตรียมจิตมั่น)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน
(ดร.มนพิชา ศรีสะอาด)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นภา ตั้งเตรียมจิตมั่น)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงกลณี จงอร่ามเรือง)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุยาวดี ตันติวรานุรักษ์)
วันที่...24...เดือน...พฤษภาคม.....พ.ศ. 2557

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้ทำวิจัยต้องขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นภา ตั้งเตรียมจิตมั่น อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา แนวคิด คำแนะนำ และสละเวลาในการตรวจสอบ แก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้นด้วยความดูแลเอาใจใส่ และความเมตตาตลอดงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด ประธานกรรมการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงกลณี จงอร่ามเรือง กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาสละเวลาในการตรวจสอบ แก้ไข และให้แนวคิด รวมทั้งคำแนะนำอันมีคุณค่าแก่วิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณบุคคลที่มีความสำคัญมากที่สุดในชีวิต คือ คุณยาย คุณแม่ และคุณพ่อ ผู้ให้กำเนิด อบรมเลี้ยงดู และสั่งสอนให้เป็นคนดี ตลอดจนญาติพี่น้องทุกคนที่ให้กำลังใจ และเป็นที่ปรึกษาที่ดีที่สุดในยามที่พบกับปัญหาอุปสรรค ท้อแท้ หมดกำลังใจให้ผ่านไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้ทำวิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ อบรม ชี้แนะแนวทางในการเรียน และในทุก ๆ ด้านเป็นอย่างดี รวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่กรุณาให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกในด้านสารเคมี และอุปกรณ์การทดลองต่าง ๆ จนทำให้งานวิจัย และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กนกพร จินดาพรรณ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

54910061: สาขาวิชา: เคมี; วท.ม. (เคมี)
คำสำคัญ: บราสสิโนไลด์/ บราสสิโนสเตียรอยด์/ แคนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด/ น้ำหมักชีวภาพ/ สเปกโทรฟลูออโรเมทรี

กนกพร จินดาพรรณ: การหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ในน้ำหมักชีวภาพ (DETERMINATION OF BRASSINOSTEROIDS PLANT HORMONES IN BIO-EXTRACTS) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: นภา ตั้งเตรียมจิตมั่น, Ph.D. 65 หน้า. ปี พ. ศ. 2557.

วิธีวิเคราะห์ทางสเปกโทรฟลูออโรเมทรีได้ถูกพัฒนาขึ้นสำหรับการหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ โดยอาศัยพื้นฐานการเกิดปฏิกิริยาระหว่างบราสสิโนไลด์ และแคนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด สภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ ความเข้มข้นของแคนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด คือ 90 ไมโครโมลาร์ อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสม คือ 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) เป็นเวลา 20 นาที ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 โดยความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น และคายแสง สำหรับการตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ 380 และ 505 นาโนเมตร ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 1-50 ไมโครโมลาร์ ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (3*SD*/*slope*) คือ 38 นาโนโมลาร์ และขีดจำกัดในการหาปริมาณ (10*SD*/*slope*) คือ 127 นาโนโมลาร์ วิธีการเติมสารละลายมาตรฐานถูกนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ และปุ๋ยน้ำ โดยไม่ต้องมีการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

54910061: MAJOR: CHEMISTRY; M.Sc. (CHEMISTRY)

KEYWORDS: BRASSINOLIDE/ BRASSINOSTEROIDS/ DANSYLAMINOPHENYLBORONIC ACID/ BIO-EXTRACTS/ SPECTROFLUOROMETRY

KANOKPORN CHINDAPHAN: DETERMINATION OF BRASSINOSTEROIDS PLANT HORMONES IN BIO-EXTRACTS. ADVISORY COMMITTEE: NAPA TANGTREAMJITMUN, Ph.D. 65 P. 2014.

A spectrofluorometric method was developed for quantitative determination of brassinosteroids plant hormones equivalent to brassinolide based on the reaction between brassinolide and dansylaminophenylboronic acid. The 90 μM of 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*/ *slope*) of 38 nM and limit of quantitation (10*SD*/ *slope*) of 127 nM were obtained by this method. Standard addition was used for the determination of brassinosteroids equivalent to brassinolide in bio-extract and liquid fertilizer samples, without any sample preparation.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

สารบัญ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่

1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 3

1.4 ขอบเขตของการวิจัย..... 3

2 ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1.1 ฮอร์โมนพืชบราสสิโนไลด์ (Brassinolide)..... 4

2.1.2 แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (Dansylaminophenylboronic acid, DABA)..... 8

2.1.3 น้ำหมักชีวภาพ (Bio-extract)..... 12

2.1.4 เทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมทรี (Spectrofluorometry Technique)..... 12

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 19

3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 25

3.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์..... 25

3.2 สารเคมี..... 25

3.3 การเตรียมสารละลาย..... 26

3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์..... 27

3.4.1 ความยาวคลื่นที่ใช้ (λ_{ex} และ λ_{em})..... 27

3.4.2 ค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์..... 28

3.4.3 ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์..... 28

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	3.4.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา	28
	3.4.5 ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา	28
	3.4.6 ความเข้มข้นของสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด	28
	3.5 การประเมินประสิทธิภาพของวิธี (Evaluation of method performance)	29
	3.5.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)	29
	3.5.2 กราฟมาตรฐาน (Calibration curve)	29
	3.5.3 ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และ ขีดจำกัดการหาปริมาณ (Limit of quantification, LOQ)	29
	3.5.4 ความเที่ยง (Precision)	30
	3.5.5 ผลของน้ำตาลต่อการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์	30
	3.5.6 การหาค่าร้อยละการได้กลับคืน (% Recovery)	31
	3.6 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี (NMR-Spectroscopy)	32
	3.7 การวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์ในตัวอย่าง	32
4	ผล และอภิปรายการทดลอง	33
	4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์	33
	4.1.1 ความยาวคลื่นที่ใช้ (λ_{ex} และ λ_{em})	33
	4.1.2 ค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์	34
	4.1.3 ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์	35
	4.1 4 อุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา	36
	4.1.5 ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา	37
	4.1.6 ความเข้มข้นของสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด	38
	4.2 การประเมินประสิทธิภาพของวิธี (Evaluation of method performance)	39
	4.3 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของสารตัวอย่าง	47
	4.4 ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์ในตัวอย่าง	52

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 สรุปผลการทดลอง	54
บรรณานุกรม	55
ภาคผนวก	59
ภาคผนวก ก	60
ภาคผนวก ข	62
ประวัติย่อของผู้วิจัย	65

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4-1	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการศึกษาความเที่ยง (n = 7).....	41
4-2	ค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ (n = 3).....	44
4-3	ค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ในตัวอย่างปุ๋ยน้ำ (n = 3).....	46
4-4	ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ ในหน่วยไมโครโมลาร์ (n = 3).....	52
4-5	ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างปุ๋ยน้ำ ในหน่วยไมโครโมลาร์ (n = 3).....	53
1ก	ความเข้มข้นของสารที่สนใจ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ยอมรับได้ ตามมาตรฐานของ Association of Official Analytical Chemists International (1993).....	61
1ข	ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร (n = 3).....	64
2ข	ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ในตัวอย่างปุ๋ยน้ำ ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร (n = 3).....	64

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 โครงสร้างทางเคมีของบราสสิโนไลด์ (Brassinolide)..... 5

2-2 โครงสร้างทางเคมีของแคสตาสเตอโรน (Castasterone)..... 5

2-3 โครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์..... 6

2-4 ปฏิกิริยาเคมีของแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด กับหมู่ไดออล (Vicinal diols) เกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่มีลักษณะเป็นวงที่สามารถให้ฟลูออเรสเซนซ์ได้..... 8

2-5 โครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ที่เป็นไปได้ 3 แบบ สำหรับการเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์ของบราสสิโนไลด์ กับรีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด..... 9

2-6 โครงสร้างทางเคมีของแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ในระบบของ PET..... 10

2-7 แผนภาพพลังงานออร์บิทัลของฟรอนเทียร์ (Frontier Orbital Energy Diagram) และระบบของ PET ที่เกิดฟลูออเรสเซนซ์ได้น้อย..... 11

2-8 แผนภาพพลังงานออร์บิทัลของฟรอนเทียร์ (Frontier Orbital Energy Diagram) และระบบของ PET ที่เกิดฟลูออเรสเซนซ์ได้มาก..... 11

2-9 แผนภาพระดับพลังงาน Jablonski ที่อธิบายเกี่ยวกับการดูดกลืนแสงการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ และการเกิดฟอสฟอเรสเซนซ์..... 13

2-10 สเปกตรัมการกระตุ้น (สเปกตรัมดูดกลืน) และสเปกตรัมการคายแสงของ quinine sulfate..... 14

2-11 ตัวอย่างคิวเวตชนิดต่าง ๆ และการวางตำแหน่งของคิวเวต ที่สามารถใช้ในการแก้ปัญหาของ Inner filter effect ได้..... 16

2-12 การเปรียบเทียบการวัดระหว่าง Steady-state และ Time-resolved fluorescence spectroscopy..... 18

2-13 ปฏิกิริยาเคมีของบราสสิโนไรด์ กับ 9-ฟีแนนทรีนบอโรนิค แอซิด (9-Phenanthreneboronic acid, PBA)..... 20

4-1 ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมของสารละลายบราสสิโนไรด์ที่ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ กับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (ความกว้างของช่องแสงการกระตุ้น และความกว้างของช่องแสงการคายแสง ที่ 10 และ 5 นาโนเมตร ตามลำดับ)..... 34

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-2 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ต่างกัน.. 35

4-3 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ต่างกัน..... 36

4-4 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างกัน..... 37

4-5 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อทำปฏิกิริยาที่ระยะเวลาต่างกัน..... 38

4-6 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ความเข้มข้นของสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิดต่างกัน..... 39

4-7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์..... 40

4-8 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์..... 40

4-9 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์เมื่อผสมด้วยสารละลายชนิดต่าง ๆ กับสารมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 10 ไมโครโมลาร์..... 42

4-10 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของสารมาตรฐานบราสสิโนไลด์..... 48

4-11 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของสารสกัดจากน้ำหมักชีวภาพข้าว..... 48

4-12 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของสารสกัดจากปุ๋ยน้ำ ค..... 49

4-13 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของสารสกัดจากปุ๋ยน้ำ ง..... 49

4-14 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ 28-โฮโมบราสสิโนไลด์ ที่ได้จากการคำนวณ โดยโปรแกรม ChemDraw..... 50

4-15 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ 28-นอร์บราสสิโนไลด์ ที่ได้จากการคำนวณ โดยโปรแกรม ChemDraw..... 50

4-16 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ 24-อีพิบราสสิโนไลด์ ที่ได้จากการคำนวณ โดยโปรแกรม ChemDraw..... 51

4-17 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของแคสตาสเตอโรน ที่ได้จากการคำนวณ โดยโปรแกรม ChemDraw..... 51

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University