บทที่ 2
ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

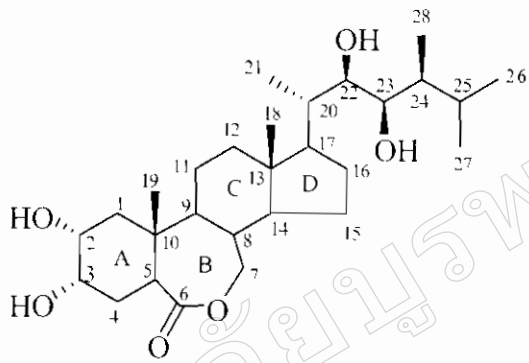
2.1.1 ฮอร์โมนพืชบราสสิโนไลด์ (Brassinolide Plant Hormones)

"พืช" เป็นสิ่งมีชีวิตที่เจริญเติบโต โดยสะสมพลังงานจากแสงอาทิตย์มาสร้างโมเลกุลที่ใหญ่ และซับซ้อนอย่างต่อเนื่องจากไอออนและโมเลกุลของสารที่มีขนาดเล็ก ซึ่งเป็นวัตถุดิบเพื่อใช้ในการดำรงชีวิต การเจริญเติบโตของพืชขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ปริมาณแสง อาหาร น้ำ ชนิดของดิน แร่ธาตุต่าง ๆ ในดิน อุณหภูมิ สารควบคุมการเจริญเติบโต และฮอร์โมนพืช เป็นต้น (นพดล จรัสสัมฤทธิ์, 2537; พีรเดช ทองอำไพ, 2537)

ฮอร์โมนพืช (Plant hormones) คือ สารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นในส่วนใดส่วนหนึ่ง เช่น ใบอ่อน ราก หรือลำต้น แล้วลำเลียงไปยังส่วนอื่น ๆ มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีระของพืช มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช การขยายพันธุ์ การเร่งการออกดอก การติดผล การเพิ่มขนาดผล เป็นต้น ความเข้มข้นของฮอร์โมนพืชที่พืชสร้างขึ้นนี้จะอยู่ในระดับที่ต่ำมาก (10^{-6}-10^{-5} โมลาร์) (อานัฐ ตันโช, 2555) ฮอร์โมนพืชที่รู้จักกันดี มีอยู่ 5 กลุ่ม ได้แก่ ออกซิน (Auxins) ไซโตไคนิน (Cytokinins) จิบเบอเรลลิน (Gibberellins) กรดแอบไซซิก (Abscisic acids) และเอทิลีน (Ethylene) ต่อมาในปี ค. ศ. 1970 ได้มีการค้นพบฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ (BRs) ในสารที่สกัดจากเกสรของผักกาดก้านขาว โดยบราสสิโนสเตียรอยด์ จัดเป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ช่วยในการเจริญเติบโตของพืชได้ดีมาก โดยใช้ในปริมาณน้อยมาก เมื่อเทียบกับฮอร์โมนพืชกลุ่มอื่น ๆ ที่กล่าวมา ออกฤทธิ์ได้ที่ความเข้มข้นระดับนาโนโมลาร์ หรือต่ำกว่า (Hooley, 1996) ปัจจุบันมีฮอร์โมนมากกว่า 60 ชนิดในกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ที่ถูกค้นพบและมีการรายงานสูตรโครงสร้าง (Bajguz & Tretyn, 2003) โดยสารกลุ่มนี้จะอยู่ในรูปสเตียรอยด์อิสระ หรืออยู่กับสารประกอบน้ำตาล และกรดไขมัน สามารถพบได้ในพืชหลากหลายชนิดมาก ทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ใบเลี้ยงคู่ พืชไร้ดอก เช่น เฟิร์น เกสรของถั่วลันเตา เกสรของข้าวโพด เกสรดอกทานตะวัน เกสรดอกส้ม เมล็ดต้นเอ็ลดา ใบชาเขียว ใบต้นเกาลัด ใบสาหร่าย ถั่วเหลือง ถั่วลิสงเถา (Pinto peanut) เป็นต้น (Takatsuto, 1994)

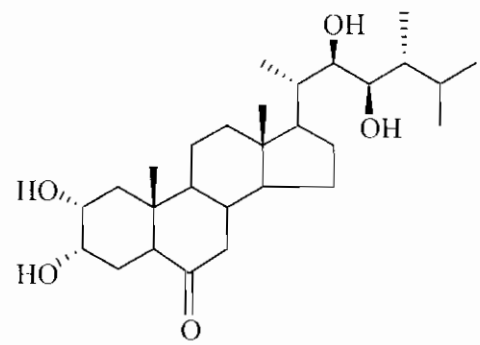
บราสสิโนสเตียรอยด์ตัวแรกที่ถูกค้นพบ คือ บราสสิโนไลด์ (Brassinolide) โครงสร้างดังในภาพที่ 2-1 มีวง 4 วงติดกัน และมีคาร์บอน 28 ตัวต่อกันเป็นโครงสร้างหลัก สำหรับฮอร์โมนตัวอื่น ๆ ที่อยู่ในกลุ่มของบราสสิโนสเตียรอยด์ จะแตกต่างกันที่จำนวนของหมู่ไฮดรอกซิลที่ต่ออยู่

กับวง A การมี หรือไม่มีกลุ่มคีโตน หรือแลกโตนที่ต่ออยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ในวง B หรือชนิดของหมู่ต่าง ๆ ที่มาต่ออยู่กับโครงสร้างหลัก และการวางตัวของหมู่ต่าง ๆ ที่มาต่ออยู่กับโครงสร้างหลัก (Zullo & Adam, 2002)



ภาพที่ 2-1 โครงสร้างทางเคมีของบราสสิโนไลด์ (Brassinolide)

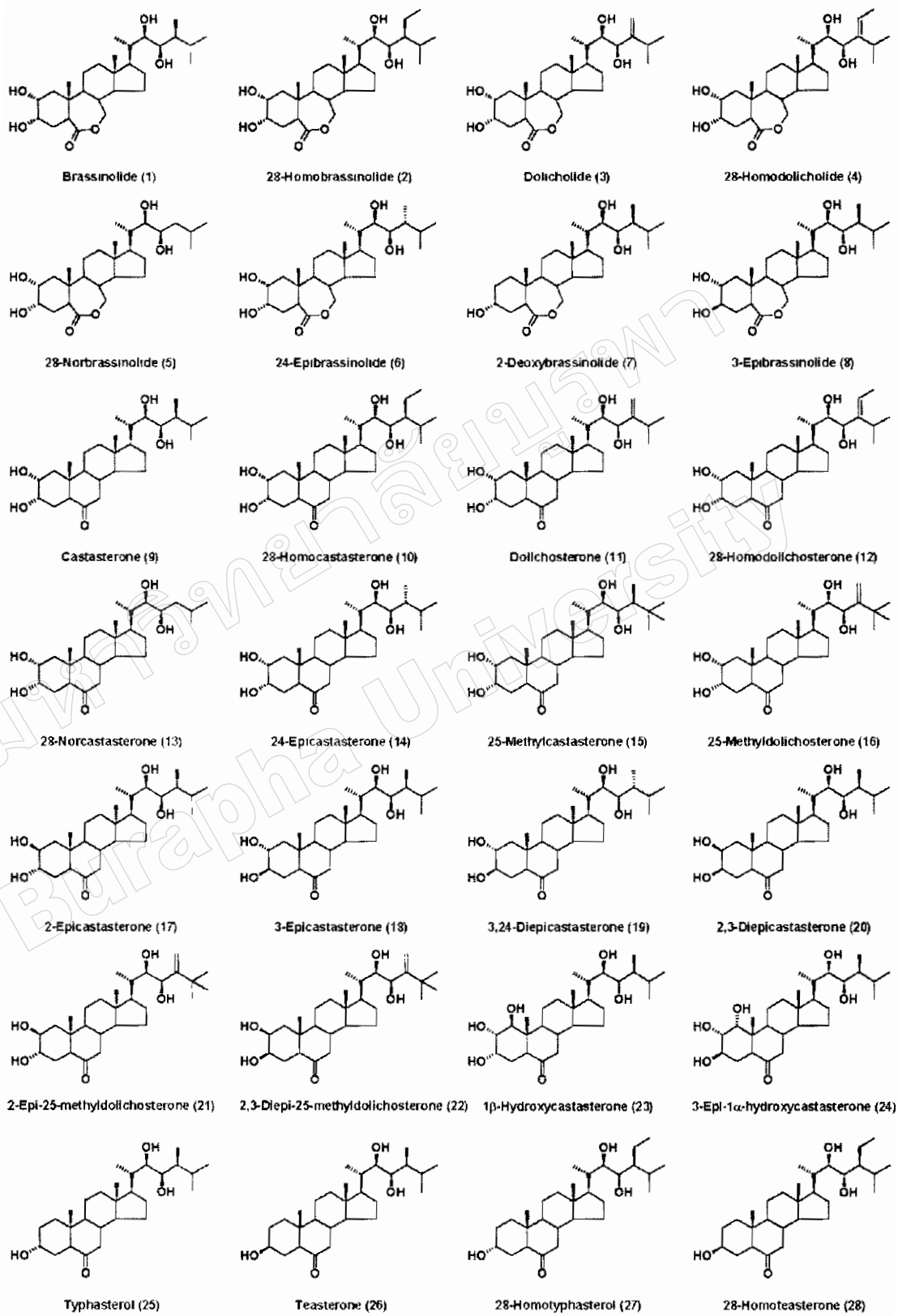
นอกจากบราสสิโนไลด์ ฮอร์โมนที่เป็นที่รู้จัก และพบมากอีกตัวในฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ คือ แคสตาสเตอโรน (Castasterone) โครงสร้างแสดงดังในภาพที่ 2-2 แคสตาสเตอโรนเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากเมแทบอลิกของบราสสิโนไลด์ และโครงสร้างทางเคมีของบราสสิโนไลด์จะคล้ายกับโครงสร้างทางเคมีของแคสตาสเตอโรนมาก แต่บราสสิโนไลด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าแคสตาสเตอโรนถึง 5 เท่า (Clouse, 2004) จึงนำมาประยุกต์ใช้ในทางการเกษตรมากกว่า



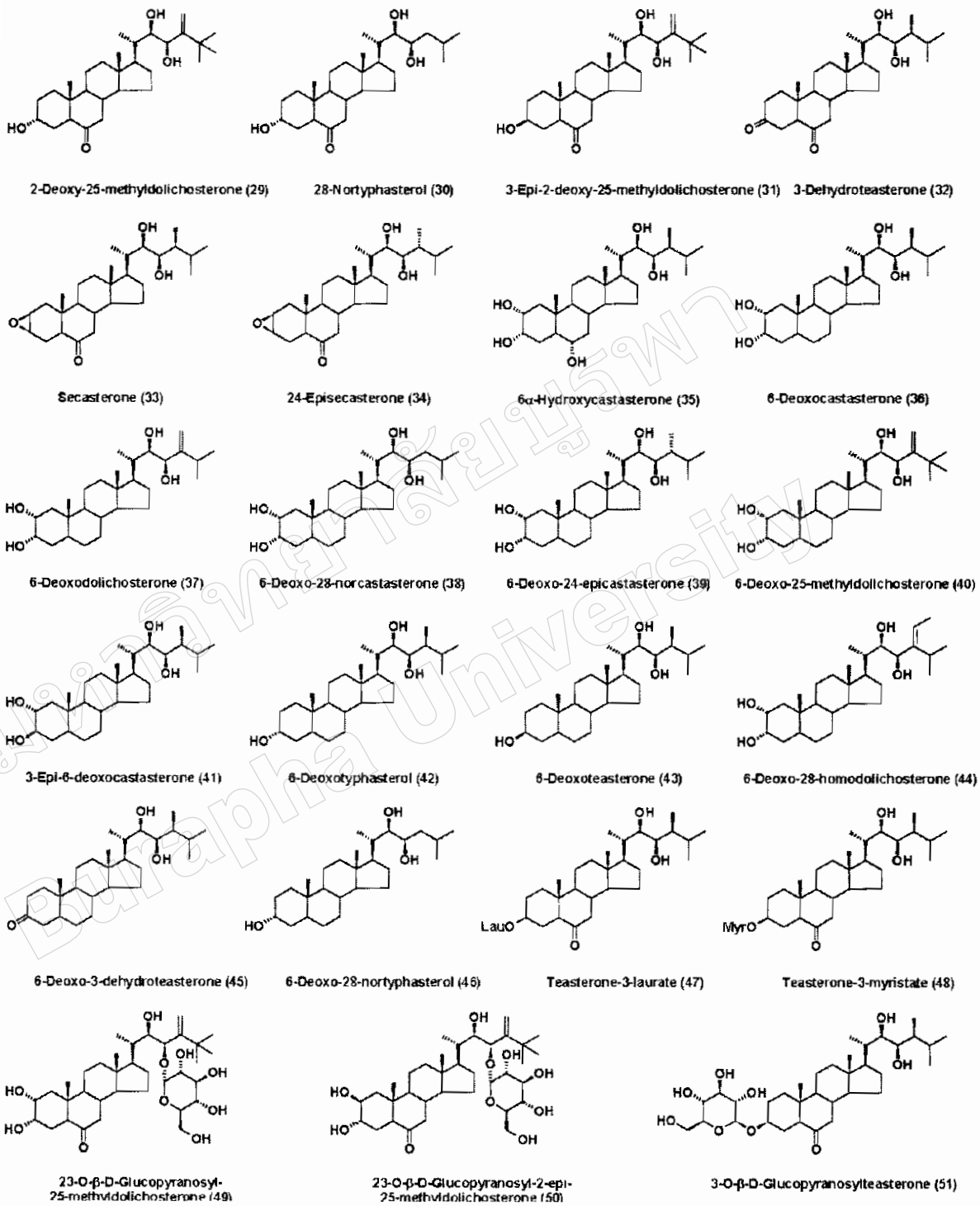
ภาพที่ 2-2 โครงสร้างทางเคมีของแคสตาสเตอโรน (Castasterone)

ฮอร์โมนพืชตัวอื่น ๆ ในกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ที่มีรายงานอีก 51 ตัว มีสูตรโครงสร้างดังในภาพที่ 2-3 และมีชื่อเรียกต่าง ๆ กันออกไป ดังแสดงใต้สูตรโครงสร้าง (Clouse, 2004)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



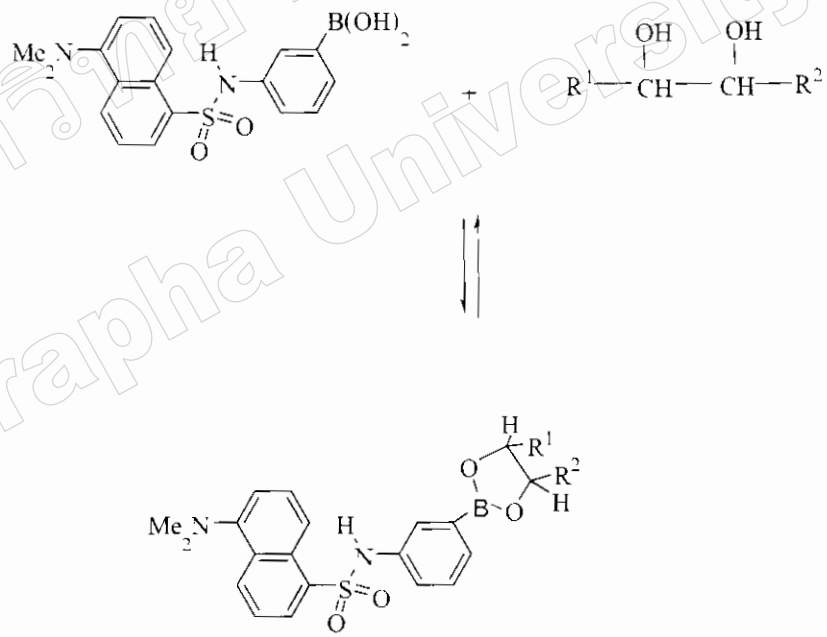
ภาพที่ 2-3 โครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ (Clouse, 2004)



ภาพที่ 2-3 โครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ (ต่อ) (Clouse, 2004)

2.1.2 แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (Dansylaminophenylboronic acid, DABA)

แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ใช้เป็นตัวตรวจวัดทางเคมีเชิงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent chemosensor) และใช้เป็นรีเอเจนต์กันอย่างแพร่หลายสำหรับการทำอนุพันธ์กับน้ำตาลฟรุกโทส หรือน้ำตาลชนิดอื่น ๆ (Crespo-Otero, Suardiaz, Pina-Luis, Valdes, Diaz-Garcia, & Montero, 2008; Luis, Granda, Badia, & Diaz-Garcia, 1998) โดยแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด เป็นฟลูออโรฟอร์ที่เกิดปฏิกิริยากับหมู่ไดออล (Vicinal diols) (หมู่ไฮดรอกซิลบนอะตอมของคาร์บอนที่อยู่ติดกัน) และอะมิโนแอลกอฮอล์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารเชิงซ้อนที่มีลักษณะเป็นวง (ดังภาพที่ 2-4) (Gamoh, Okamoto, Takatsuto, & Tejima, 1990; Gamoh, Omote, Okamoto, & Takatsuto, 1989; Takatsuto, Omote, Gamoh, & Ishibashi, 1990; Winter, Schneider, Meyenburg, Strack, & Adam, 1999)

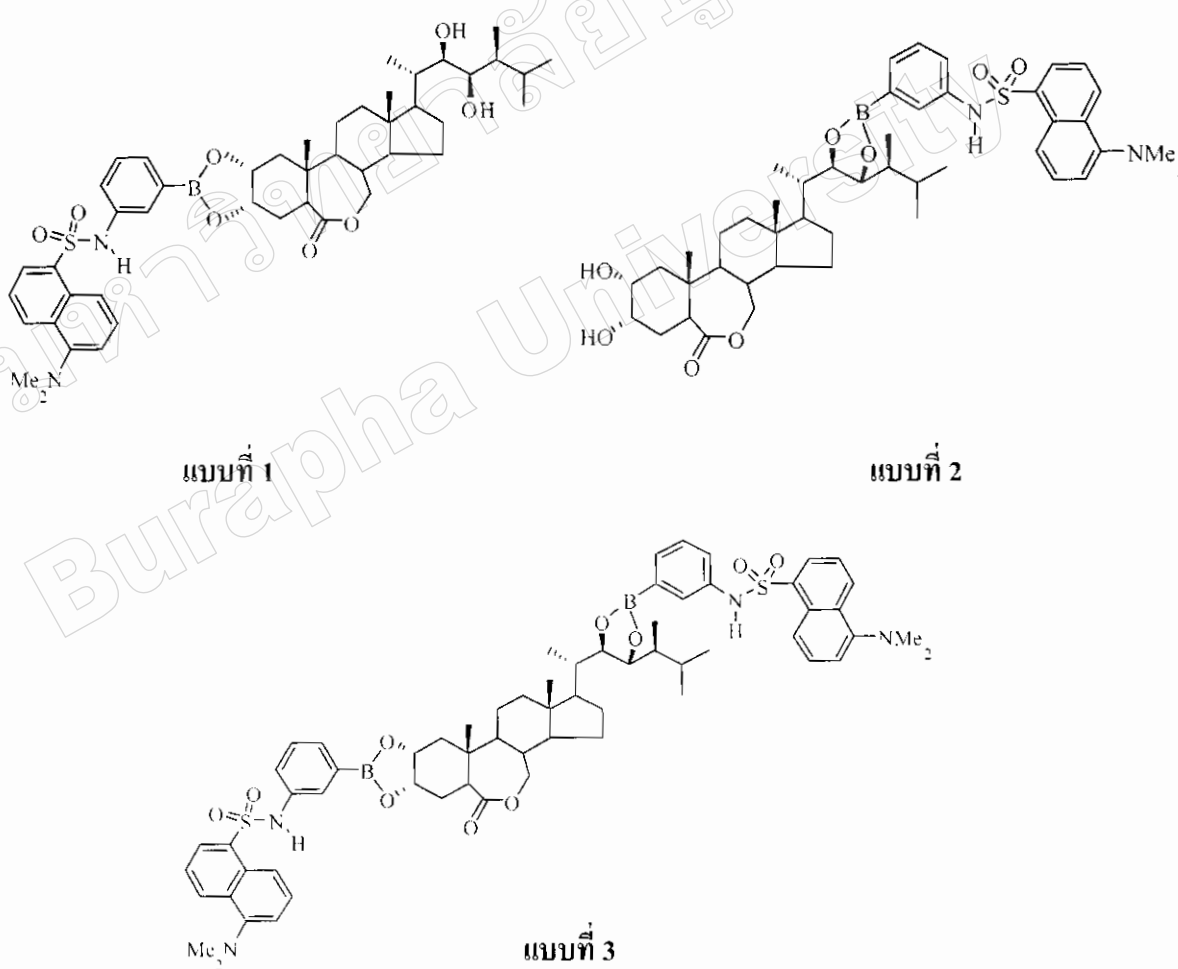


ภาพที่ 2-4 ปฏิกิริยาเคมีของแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด กับหมู่ไดออล (Vicinal diols) เกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่มีลักษณะเป็นวงที่สามารถให้ฟลูออเรสเซนซ์ได้ (Reagents for Modifying Alcohols-Section 3.2, 2555)

ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ และความยาวคลื่นที่เกิดพีกขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมรอบ ๆ แดนซิลที่เป็นฟลูออโรฟอร์ และจากภาพที่ 2-3 จะสังเกตได้ว่าฮอร์โมนเกือบทุกตัวในกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์มีหมู่ไดออล ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ซึ่งเรียกว่า Side-chain *cis*-diol

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ดังนั้นบราสสิโนไลด์จึงสามารถเกิดปฏิกิริยากับรีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด แล้วให้ผลิตภัณฑ์ที่วัดการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ โดยสามารถทำนายโครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ที่เป็นไปได้ 3 รูปแบบ คือ แบบที่ 1: เข้าทำปฏิกิริยาบริเวณหมู่ไดออล ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 แบบที่ 2: เข้าทำปฏิกิริยาบริเวณหมู่ไดออล ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 22 และ 23 (Gamoh, Okamoto, Takatsuto, & Tejima, 1990; Takatsuto, Omote, Gamoh, & Ishibashi, 1990; Winter, Schneider, Meyenburg, Strack, & Adam, 1999) และแบบที่ 3: เข้าทำปฏิกิริยาบริเวณหมู่ไดออล ทั้ง 2 ตำแหน่ง คือ ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 และที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 22 และ 23 (Gamoh, Omote, Okamoto, & Takatsuto, 1989) แสดงดังในภาพที่ 2-5



ภาพที่ 2-5 โครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ที่เป็นไปได้ 3 แบบ สำหรับการเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์ของบราสสิโนไลด์ กับรีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด

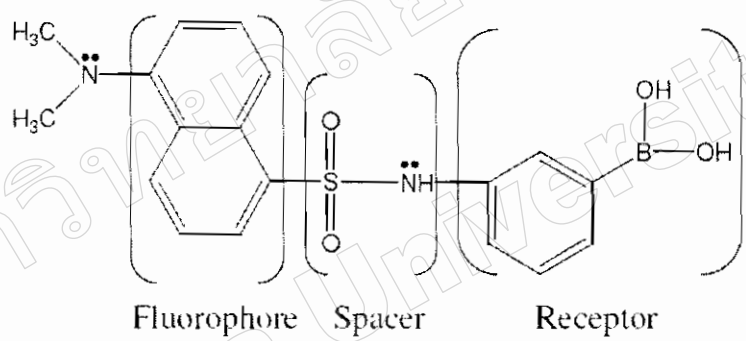
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเกิดฟลูออเรสเซนซ์ของรีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด สามารถอธิบายได้ด้วยทฤษฎีระบบถ่ายโอนอิเล็กตรอนที่ถูกเหนี่ยวนำเชิงแสง (Photo Induced Electron Transfer Systems, PET) โดยทั่วไปสารประกอบที่ใช้โมเดล PET ในการอธิบายจะประกอบด้วย 3 ส่วนสำคัญ คือ

1. ฟลูออโรฟอร์ (Fluorophore) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นพวกพอลิไซคลิก อะโรมาติก และเป็นบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงเชิงแสงขึ้นเมื่อมีการกระตุ้นและการคายแสง

2. สเปเซอร์ (Spacer) เป็นส่วนที่อยู่ใกล้กับฟลูออโรฟอร์ (Fluorophore) และตัวรับ (Receptor)

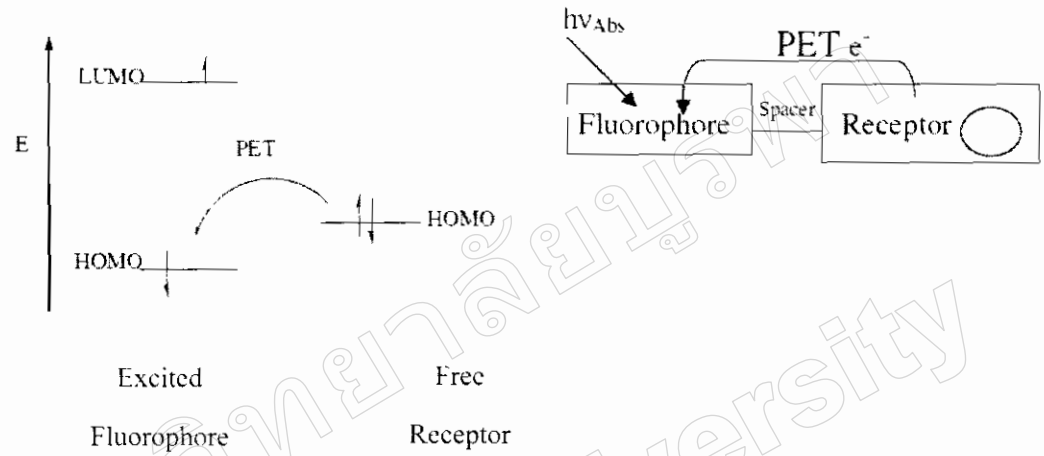
3. ตัวรับ (Receptor) เป็นบริเวณที่มีการเกิดเป็นสารเชิงซ้อนขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 2-6



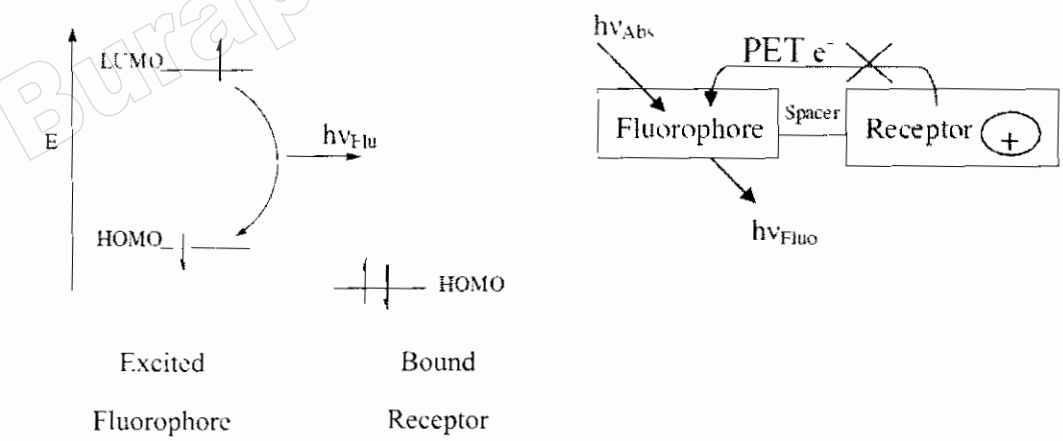
ภาพที่ 2-6 โครงสร้างทางเคมีของแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ในระบบของ PET (Bulut, 2006)

เพื่อให้มีความเข้าใจเกี่ยวกับระบบของ PET มากขึ้น สามารถใช้แผนภาพระดับพลังงานเชิงโมเลกุลในการอธิบายได้ โดยในกรณีที่ไม่มีโมเลกุล หรือไอออนของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Guest) มาต่อที่บริเวณตัวรับ (Receptor) จะเรียกว่า "Receptor-free situation" ระบบ PET จะเป็นแบบ "Switched off" และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์จะเกิดขึ้นได้น้อย ดังภาพที่ 2-7 โดยตัวรับ (Receptor) สามารถที่จะถ่ายโอนอิเล็กตรอนไปยังออร์บิทัลของโมเลกุลฟลูออโรฟอร์ที่ถูกกระตุ้นได้ ซึ่งอิเล็กตรอนที่ถูกกระตุ้นในส่วนของฟลูออโรฟอร์จะไม่สามารถกลับลงมาสู่ออร์บิทัลเดิมได้ และในทางกลับกันเมื่อโมเลกุลหรือไอออนของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Guest) มาต่อหรือเกิดการโคออร์ดิเนชันขึ้นที่บริเวณตัวรับ (Receptor) ดังภาพที่ 2-8 ระดับพลังงานของ HOMO ของตัวรับจะลดลงต่ำกว่า HOMO ของฟลูออโรฟอร์ และอิเล็กตรอนของตัวรับ (Receptor) ไม่สามารถถ่ายโอนไปยังฟลูออโรฟอร์ได้ ดังนั้นกระบวนการ PET จึงไม่เกิดขึ้น โดยอิเล็กตรอนที่ถูกกระตุ้นของฟลูออโรฟอร์จะลดระดับพลังงานลง และมีคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมาได้มากขึ้น จึงกล่าวได้ว่า

การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของโมเลกุลจะเกิดขึ้นได้น้อย ถ้าไม่มีการโคออร์ดิเนชันระหว่างตัวรับ (Receptor) และโมเลกุลหรือไอออนของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Guest) นอกจากนี้ยังมีกลไกอื่น ๆ ที่จะยับยั้งการถ่ายโอนอิเล็กตรอนด้วย เช่น การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (Conformation) ของโมเลกุลเมื่อเกิดเป็นสารเชิงซ้อน เป็นต้น ซึ่งส่งผลต่อเกิดฟลูออเรสเซนซ์ได้ (Luis, Granda, Badia, & Diaz-Garcia, 1998)



ภาพที่ 2-7 แผนภาพพลังงานออร์บิทัลของฟรอนเทียร์ (Frontier Orbital Energy Diagram) และระบบของ PET ที่เกิดฟลูออเรสเซนซ์ได้น้อย (Seckin, 2004)



ภาพที่ 2-8 แผนภาพพลังงานออร์บิทัลของฟรอนเทียร์ (Frontier Orbital Energy Diagram) และระบบของ PET ที่เกิดฟลูออเรสเซนซ์ได้มาก (Seckin, 2004)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Guest) เกิดอันตรกิริยากับตัวรับ (Receptor) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ โดยผ่านทางการเกิดเป็นวงคีเลตของโมเลกุลที่เกิดการโคออร์ดิเนชันแล้วทำให้เกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้น ในกรณีของบราสสิโนไลด์ เมื่อเกิดอนุพันธ์กับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด แล้วจะทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณของบราสสิโนไลด์

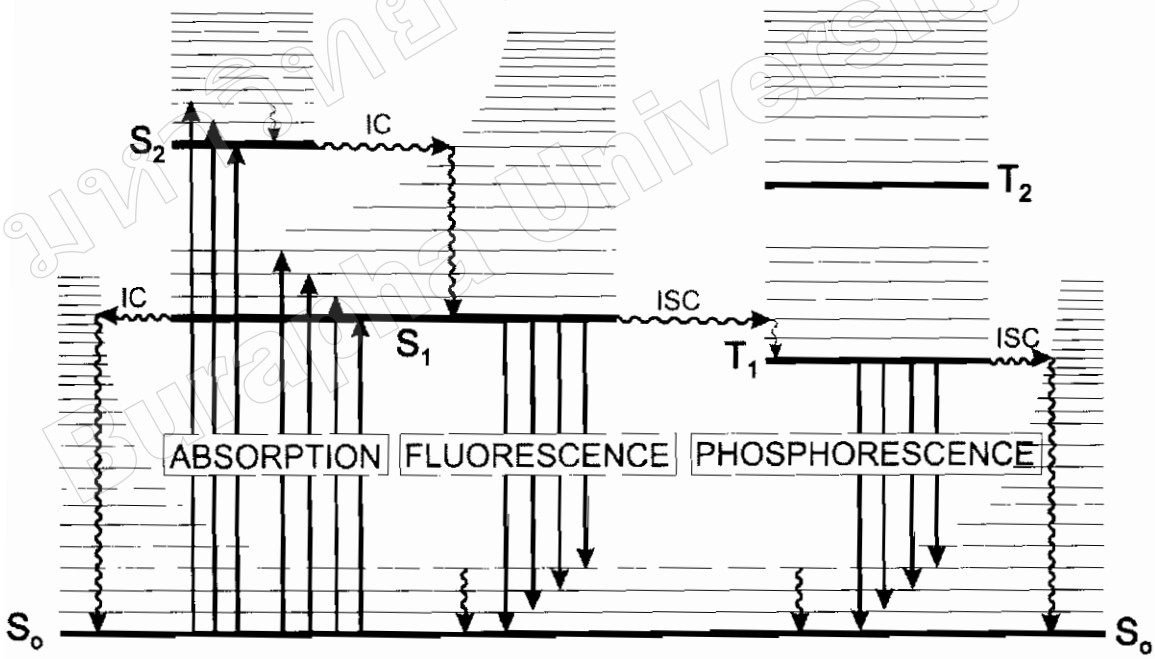
2.1.3 น้ำหมักชีวภาพ (Bio-extract)

น้ำหมักชีวภาพ หรือน้ำสกัดชีวภาพ เป็นสารละลายเข้มข้นที่ได้จากการหมักเศษพืชหรือสัตว์ (เยาวพา จิระเกียรติกุล และนฤมล วชิรปัทมา, 2551) หรือเป็นของเหลวที่ได้มาจากวิธีการสกัดน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืช และเซลล์สัตว์ ซึ่งประกอบด้วยสารอินทรีย์ โดยใช้น้ำตาล หรือกากน้ำตาล (Molasses) ใส่ลงไปจะได้น้ำเลี้ยงที่สกัดออกมาเป็นสีน้ำตาล โดยกระบวนการ "พลาสมอลิซิส (Plasmolysis)" ซึ่งมีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่ทำหน้าที่ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ให้มีโมเลกุลเล็กลง โดยใช้น้ำตาล หรือกากน้ำตาลเป็นแหล่งให้อาหาร และพลังงานของจุลินทรีย์ สามารถหมักได้ทั้งในสภาพที่มี และไม่มีออกซิเจน น้ำสกัดชีวภาพ หรือน้ำหมักชีวภาพที่ได้นี้จะมีทั้งจุลินทรีย์ธรรมชาติที่เกิดขึ้นหลากหลายชนิด รวมทั้งมีสารประกอบที่สกัดได้จากเซลล์พืช และเซลล์สัตว์ชนิดต่าง ๆ เช่น สารจำพวกคาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน ฮอร์โมน เอนไซม์ เป็นต้น น้ำสกัดชีวภาพจะเกิดขึ้นมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำเลี้ยงในต้นพืช โดยปกติทั่วไป น้ำเลี้ยงในต้นพืชสดจะมีอยู่ประมาณ 90-98 เปอร์เซ็นต์ ถ้าใช้ส่วนของพืชที่มีน้ำมาก เป็นวัตถุดิบน้ำสกัดก็จะเกิดขึ้นมาก ภายในระยะเวลาเพียง 2-3 วัน แต่เนื่องจากกระบวนการทำในระยะแรกเกี่ยวข้องกับกระบวนการสกัดน้ำเลี้ยงจากเซลล์ทางชีวภาพ (Bio-extract) และในช่างหลังเกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก ดังนั้น นักวิชาการบางกลุ่ม จึงเรียกน้ำสกัดชีวภาพว่า "น้ำหมักชีวภาพ" (น้ำหมักชีวภาพ เทคโนโลยีภูมิปัญญาชาวบ้าน เพื่อเศรษฐกิจพอเพียงสู่นวัตกรรมเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน, 2552; มุกดา สุขสวัสดิ์, 2545; เยาวพา จิระเกียรติกุล และนฤมล วชิรปัทมา, 2551)

2.1.4 เทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมทรี (Spectrofluorometry Technique)

ศาสตราจารย์ อเล็กซานเดอร์ แจบลอนสกี (Professor Alexander Jablonski) ผู้ที่ได้รับการยกย่องให้เป็นบิดาแห่งฟลูออเรสเซนซ์ สเปกโทรสโกปี ผู้ซึ่งคิดค้นแผนภาพแสดงกระบวนการดูดกลืนและการคายของแสง ที่เรียกว่า "แผนภาพระดับพลังงาน Jablonski" ดังภาพที่ 2-9 โดยเมื่อโมเลกุลได้รับแสงในช่วงยูวี-วิสิเบิ้ล โมเลกุลจะถูกกระตุ้นจากสถานะพื้น (S_0) ไปยังสถานะกระตุ้นที่หนึ่ง (S_1) หรือสถานะกระตุ้นที่สอง (S_2) สมดุลของอิเล็กตรอน โมเลกุลของตัวทำละลายจะถูกรบกวน และจะเกิดการจัดตัวเข้าสู่สมดุลใหม่ เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เรียกว่า Internal conversion โดยเกิดขึ้นในช่วงเวลาสั้น ๆ 10^{-12} วินาที หรือน้อยกว่า (Lakowicz, 2006) โมเลกุลที่ถูกกระตุ้นจะ

พยายามกลับมาอยู่ในสถานะพื้นของการสั่นที่อยู่ภายในสถานะถูกกระตุ้นก่อน โดยที่การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่มีการคายพลังงานเกิดขึ้นเลย หลังจากนั้นโมเลกุลจึงย้ายสถานะจากสถานะพื้นของการสั่นที่อยู่ภายในสถานะถูกกระตุ้น (S_1) กลับลงมายังสถานะของการสั่นใด ๆ ที่อยู่ภายในสถานะพื้น (S_0) พร้อมกับคายพลังงานออกมาซึ่งอยู่ในรูปของพลังงานแสง เรียกกระบวนการคายแสงแบบนี้ว่า "การเกิดฟลูออเรสเซนซ์" หรือการวาวแสง ซึ่งความยาวคลื่นของการเกิดฟลูออเรสเซนซ์นั้นจะยาวกว่าความยาวคลื่นของการกระตุ้น และถ้าโมเลกุลที่ถูกกระตุ้นเกิดการเปลี่ยนทิศการหมุน (Spin) จากสถานะกระตุ้นที่หนึ่ง (Singlet state, S_1) ไปเป็นสถานะกระตุ้นสาม (Triplet state, T_1) โดยการเกิด Intersystem crossing ก่อนที่จะกลับลงมาสู่สถานะพื้น (Ground state, S_0) จะเรียกกระบวนการนี้ว่า "การเกิดฟอสฟอเรสเซนซ์" หรือการเรืองแสง ซึ่งจะใช้เวลาในการเกิดนานกว่าการเกิดฟลูออเรสเซนซ์



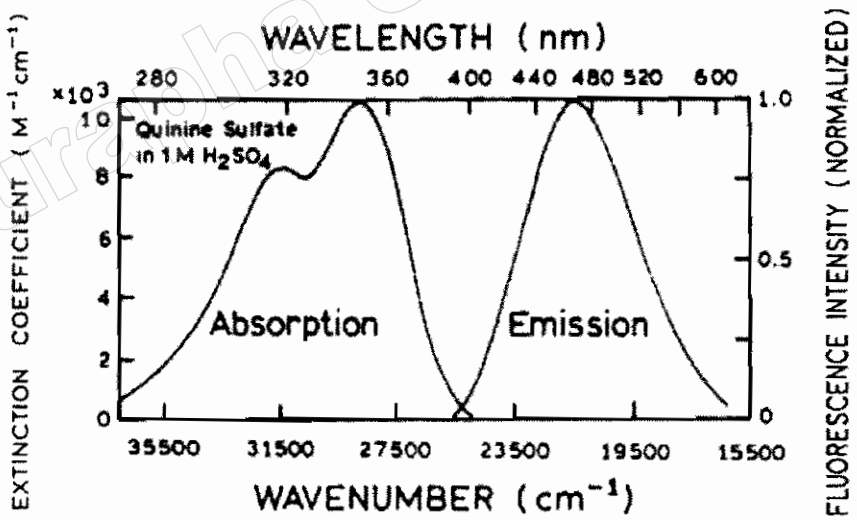
ภาพที่ 2-9 แผนภาพระดับพลังงาน Jablonski ที่อธิบายเกี่ยวกับการดูดกลืนแสง การเกิดฟลูออเรสเซนซ์ และการเกิดฟอสฟอเรสเซนซ์ (Valeur, 2001)

❑ *ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัม*

การบันทึกค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence intensity, FI) กับความยาวคลื่นแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ สเปกตรัมการกระตุ้น (Excitation spectrum) และสเปกตรัมการคายแสง

(Emission spectrum) สเปกตรัมการกระตุ้น เป็นการกำหนดให้ความยาวคลื่นของแสงที่โมเลกุลคายออกมามีค่าคงที่ และบันทึกค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่นนั้น กับความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นโมเลกุล รูปร่างของสเปกตรัมการกระตุ้นจะเหมือนกับสเปกตรัมดูดกลืน (Absorption spectrum)

สเปกตรัมการคายแสง เป็นการกระตุ้นโมเลกุลด้วยความยาวคลื่นที่คงที่ค่าหนึ่ง และบันทึกค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่แต่ละความยาวคลื่นของแสงที่คายออกมา สเปกตรัมการคายแสง จะเกิดที่ความยาวคลื่นที่ยาวกว่าสเปกตรัมการกระตุ้น เพราะระหว่างที่โมเลกุลกลับลงมาสู่สถานะพื้น ต้องมีการสูญเสียพลังงานไปในรูปอื่น ๆ ที่ไม่ใช่แสง (Non-radiation) ก่อนจะคายแสงออกมาเพื่อกลับมาอยู่ในสถานะพื้น แสงที่คายออกมาจึงมีพลังงานน้อยกว่าแสงที่ดูดกลืนเข้าไป ความยาวคลื่นของแสงที่คายออกมาจึงยาวกว่าความยาวคลื่นของแสงที่ดูดกลืนเข้าไป และถ้าสารเกิดกระบวนการฟอสฟอเรสเซนซ์ สเปกตรัมการคายแสงที่บันทึกได้ก็จะเกิดที่ความยาวคลื่นที่ยาวกว่าการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ เพราะมีการเกิด Intersystem crossing ขึ้นทำให้เสียพลังงานไปอีกส่วนหนึ่ง สเปกตรัมการกระตุ้น และสเปกตรัมการคายแสง จะเป็นภาพในกระจกเงาซึ่งกันและกัน (Mirror-image rule) ดังภาพที่ 2-10



ภาพที่ 2-10 สเปกตรัมการกระตุ้น (สเปกตรัมดูดกลืน) และสเปกตรัมการคายแสงของ quinine sulfate (Lakowicz. 2006)

❑ ***การทำปริมาณวิเคราะห์*** (Rouessac & Rouessac, 2007)

เทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมทรี เกี่ยวข้องกับกระบวนการดูดกลืนแสง และคายแสง ดังนั้นค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารที่ตรวจวัดได้ จึงขึ้นอยู่กับค่า Fluorescence quantum yield ของสารนั้น ๆ ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่างจำนวนโฟตอนที่คายออกมาต่ออัตราส่วนของโฟตอนที่ถูกดูดกลืน แสดงดังสมการ

$$\emptyset_f = \frac{I_f}{I_a}$$

เมื่อ $I_a = I_0 - I_t$

จะได้ว่า $I_f = \emptyset_f I_a$

$$I_f = \emptyset_f (I_0 - I_t)$$

$$I_f = \emptyset_f I_0 \left(1 - \frac{I_t}{I_0}\right)$$

เมื่อ $T = \frac{I_t}{I_0}$ และ $A = -\log T$

ดังนั้น $T = 10^{-A}$

จะได้ $I_f = \emptyset_f I_0 \left(1 - 10^{-A}\right)$

$$10^{-A} = 1 - 2.303A + \frac{(2.303A)^2}{2!} + \ldots$$

ในกรณีของสารละลายตัวอย่างเจือจาง ค่าการดูดกลืนแสงจะมีค่าใกล้ 0 และ 10^{-A} มีค่าประมาณ $1-2.3A$ จะได้ว่า

$$I_f = 2.3\,\emptyset_f I_0 A = 2.3\emptyset_f I_0 \varepsilon l C$$

เมื่อ

I_0	คือ	ความเข้มแสงจากแหล่งกำเนิดแสง
I_a	คือ	ความเข้มของการดูดกลืนแสง
I_f	คือ	ความเข้มฟลูออเรสเซนซ์
I_t	คือ	ความเข้มของแสงที่ส่องผ่านสารตัวอย่าง
A	คือ	ค่าการดูดกลืนแสง
C	คือ	ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง ในหน่วยโมลาร์
ε	คือ	ค่าคงที่การดูดกลืนแสงของสาร
l	คือ	ค่าความกว้างของเซลล์

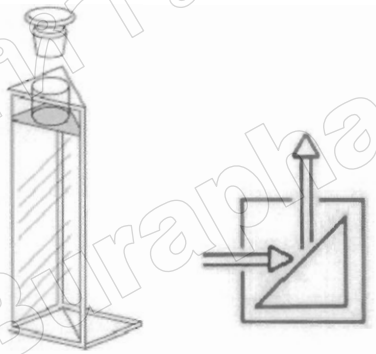
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

$\emptyset_f$ คือ ค่า Fluorescence quantum yield

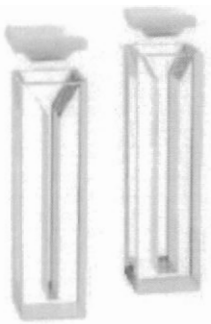
จากสมการดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (C) เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง (I และ I_0) ลักษณะโครงสร้างของสารตัวอย่างที่วิเคราะห์ (εและ $\emptyset_f$)

❑ ***ผลของ Inner filter effect ต่อการเกิดฟลูออเรสเซนซ์***

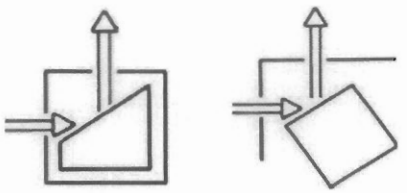
เมื่อสารละลายมีความเข้มข้นต่ำ ๆ (ค่าการดูดกลืนแสงน้อยกว่า 0.05) ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารละลาย แต่ถ้าสารละลายมีความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น โมเลกุลที่อยู่ใกล้กับแหล่งกำเนิดแสงจะดูดกลืนแสงไปหมด โมเลกุลที่อยู่ด้านหลังไม่ถูกกระตุ้น ดังนั้นแสงที่ตกกระทบจะผ่านไปเพียงครึ่งหนึ่งของทางเดินแสง ส่งผลให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจวัดได้มีค่าลดลง ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า "Inner filter effect" (Albani, 2007) ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยใช้คิวเวตสามเหลี่ยม หรือวางคิวเวตตรงตำแหน่งที่ไม่ใช่บริเวณตรงกลางทางเดินแสง หรือการใช้ไมโครเซลล์ เพื่อให้แสงสามารถตกกระทบได้ทั่วทั้งคิวเวต ดังภาพที่ 2-11



คิวเวตสามเหลี่ยม (Triangular cuvette)



ไมโครเซลล์ (Micro fluorometer cell)



ตำแหน่งที่ไม่ใช่บริเวณตรงกลางทางเดินแสง (Off-center)

ภาพที่ 2-11 ตัวอย่างคิวเวตชนิดต่าง ๆ และการวางตำแหน่งของคิวเวต ที่สามารถใช้ในการแก้ปัญหาของ Inner filter effect ได้ (Lakowicz, 2006)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

❑ ***Fluorescence quenching*** หมายถึง กระบวนการใด ๆ ที่เกิดขึ้นแล้วทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารนั้นลดลง สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้

1. Static quenching โมเลกุลฟลูออโรฟอร์จะเกิดพันธะกับลิแกนด์ และเกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่ไม่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ ทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ และค่า Quantum yield ลดลง แต่ไม่มีผลต่อ Fluorescence lifetime

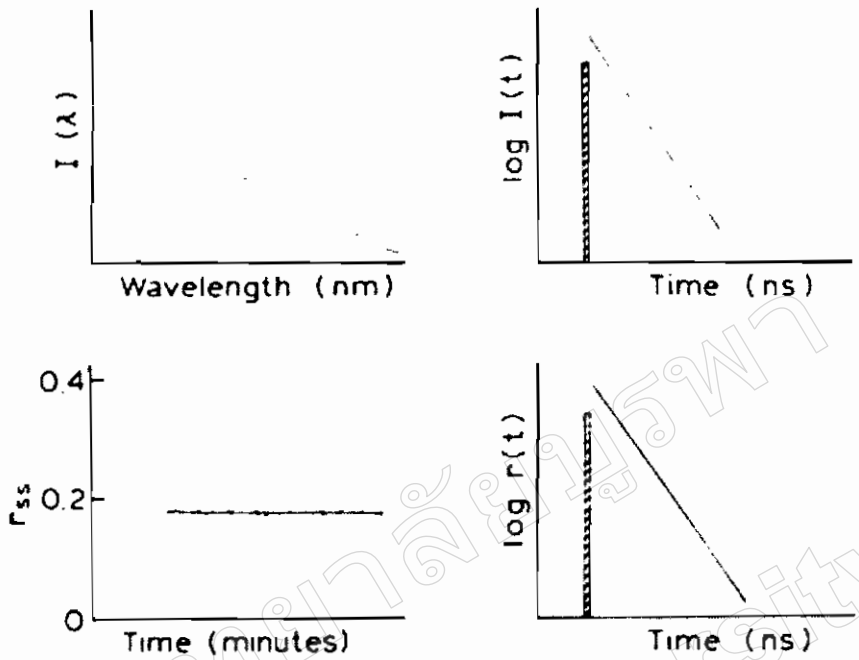
2. Dynamic quenching โมเลกุลฟลูออโรฟอร์ และQuenchers เกิดการชนกัน มีการสูญเสียพลังงาน จากนั้นโมเลกุลทั้งสองจึงแยกออกจากกัน (ไม่เกิดการสร้างพันธะกัน) ทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ Fluorescence lifetime และค่า Quantum yield ลดลง กระบวนการนี้ขึ้นกับเวลา และเกิดขึ้นที่ Excited state lifetime

3. Thermal quenching กระบวนการนี้ขึ้นกับอุณหภูมิ ทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ Fluorescence lifetime และค่า Quantum yield ลดลง

❑ ***เทคนิคการวัดค่าฟลูออเรสเซนซ์***

การวัดฟลูออเรสเซนซ์แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ Steady-state และ Time-resolved spectrophotometry การวัดแบบ Steady-state เป็นการวัดแบบทั่ว ๆ ไปที่แสดงในรูปของค่าคงที่ที่ได้จากการทดลอง ตัวอย่างเช่น การใช้แหล่งกำเนิดแสงแบบต่อเนื่อง (Continuous light source) และค่าความเข้ม หรือสเปกตรัมการคายแสงได้ถูกบันทึก (ภาพที่ 2-12) เพราะว่าสเกลเวลาของการเกิดฟลูออเรสเซนซ์อยู่ในระดับนาโนวินาที การวัดส่วนใหญ่จึงเป็นแบบ Steady-state เมื่อตัวอย่างถูกกระตุ้นด้วยแสงเป็นครั้งแรก Steady-state ก็จะเกิดขึ้นในทันทีทันใด สำหรับการวัดแบบที่สอง คือ Time-resolved โดยส่วนใหญ่จะใช้ในการวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลง ตัวอย่างเช่น การวัดตัวอย่างโดยการฉายแสงแบบไม่ต่อเนื่อง (Pulse) ค่าความเข้มที่ลดลงจะถูกบันทึกด้วยระบบการตรวจวัดที่มีความเร็วสูง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2-12 การเปรียบเทียบการวัดระหว่าง Steady-state และ Time-resolved fluorescence spectroscopy (Lakowicz, 2006)

❑ ***ข้อควรระวังของเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์***

เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ ถือเป็นเทคนิคที่มีสภาพไวในการวิเคราะห์สูง มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่วิเคราะห์สูง เพราะสารแต่ละตัวมี λ_{ex} และ λ_{em} ที่แตกต่างกัน มีขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำ ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับการหาปริมาณที่กว้าง และสามารถทำการวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ยังมีข้อควรระวังสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของสาร ดังนี้ คือ

- การสลายตัวของสารเมื่อสัมผัสแสง วิธีทางฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรโฟโตเมทรีนั้นต้องใช้แสงที่มีความเข้มสูงมาก โอกาสที่สารจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีเนื่องจากแสงจึงเพิ่มขึ้น ในการวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารจึงควรทำในเวลาที่รวดเร็ว และอาจต้องทำการเก็บสารมาตรฐานในขวดสีชาหรือขวดทึบแสง เพื่อหลีกเลี่ยงการสัมผัสแสงโดยตรง ซึ่งจะส่งผลให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ลดลง

- ความหนืด ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์จะเพิ่มขึ้น เมื่อสารละลายมีความหนืดเพิ่มขึ้น การถ่ายโอนพลังงานจะลดลง เนื่องมาจากจำนวนของโมเลกุลที่ชนกันลดน้อยลง ใช้ตัวทำละลายที่มีความหนืดสูง เช่น glycerol หรือ gelatin

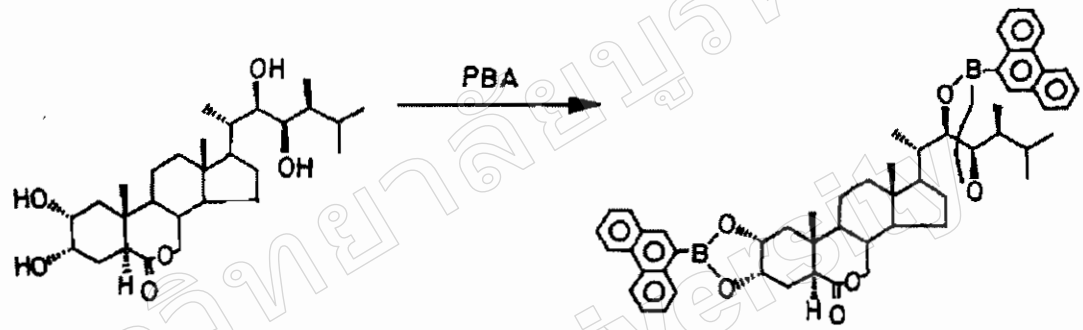
- การเกิด Quenching เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์จะลดลง (Temperature quenching) ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในสารละลาย มีผลทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ลดลง (Oxygen quenching) เมื่อความเข้มข้นของสารละลายสูงขึ้น ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์จะลดลง (Concentration quenching) เมื่อมีสารอื่นเจือปนอยู่มาก มักมีผลรบกวนต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์โดยตรง ซึ่งทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ ที่ได้จากการวิเคราะห์มีความคลาดเคลื่อนสูง (Impurity quenching)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Gamoh, Kitsuwa, Takatsuto, Fujimoto, and Ikekawa (1988) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณและแยกฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ได้แก่ บราสสิโนไลด์ บราสสิโนน28-นอร์บราสสิโนไลด์ 28-โฮโมบราสสิโนไลด์ แคสตาสเตอโรน 28-โฮโมแคสตาสเตอโรน และโดลิคลอสเตอโรน ในเกสรของถั่วปากอ้า (Broad bean) โดยการทำอนุพันธ์ที่หมู่ไดออล (Vicinol diol) กับ 1-แนพทาลีนบอโรนิค แอซิด (1-Naphthaleneboronic acid) ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่มีตัวตรวจวัดเป็นเครื่องยูวี-วิสิเบิ้ล ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ใช้รีเวิร์สเฟสคอลัมน์ Shim-pack CLC-ODS (เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 6.0 มิลลิเมตรx150 มิลลิเมตร) และ SBC-ODS (เส้นผ่านศูนย์กลางกายใน 2.5 มิลลิเมตรx150 มิลลิเมตร) เป็นเฟสคงที่ (Stationary phase) โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตไนไทรล์ กับน้ำ (CH_3CN: H_2O) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เพื่อแยกฮอร์โมนแต่ละตัวออกจากกันที่รีเทนชันไทม์ต่าง ๆ จากการวิเคราะห์ พบว่ามีปริมาณของบราสสิโนไลด์ เท่ากับ 31.2 นาโนกรัม และมีค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนไลด์ อยู่ในช่วง 88.6-95.5 เปอร์เซ็นต์

Gamoh, Omote, Okamoto, and Takatsuto (1989) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ได้แก่ บราสสิโนไลด์ โฮโมบราสสิโนไลด์ นอร์บราสสิโนไลด์ แคสตาสเตอโรน โฮโมแคสตาสเตอโรน นอร์แคสตาสเทอโรน และโดลิคลอสเตอโรน ในเกสรของถั่วปากอ้า (Broad bean, *Vicia faba L.*) โดยการทำอนุพันธ์กับ 9-ฟีแนนทรีนบอโรนิค แอซิด (9-Phenanthreneboronic acid) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) ไพริดีน และอะซิโตไนไทรล์ ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (ภาพที่ 2-13) จากนั้นตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่มี ตัวตรวจวัดเป็นเครื่องฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่นในการกระตุ้น 305 นาโนเมตร (λ_{ex}) และตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่คายออกมาที่ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตร (λ_{em}) ใช้รีเวิร์สเฟสคอลัมน์ STR ODS-II (เส้นผ่าน

ศูนย์กลางภายใน 4.0 มิลลิเมตรx150 มิลลิเมตร) เป็นเฟสคงที่ (Stationary phase) โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตไนไทรล์ กับน้ำ (CH_3CN: H_2O) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ในอัตราส่วน 90: 10 ที่อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที จากการวิเคราะห์ พบว่ามีปริมาณของบราสสิโนไลด์ โดลิคลอสเตอโรน นอร์แคสตาสเทอโรน และแคสตาสเตอโรน เท่ากับ 180.8± 3.1, 536.5± 4.5, 628.4± 3.6 และ 134.4± 2.2 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ จากนั้นทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารอนุพันธ์*บิส*ฟีแนนทรีนบอโรเนตของบราสสิโนไลด์ ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี พบว่ามีโมเลกุลลาร์ไอออน ที่มวล/ประจุ 852



ภาพที่ 2-13 ปฏิกิริยาของบราสสิโนไลด์ กับ 9-ฟีแนนทรีนบอโรนิค แอซิด
(9-Phenanthreneboronic acid, PBA)

Gamoh and Takatsuto (1989) ได้ศึกษาการทำอนุพันธ์ของบราสสิโนสเตียรอยด์ โดยใช้รีเอเจนต์ที่เป็นอนุพันธ์ของกรดบอโรนิค คือ 1-ไซยาโนไอโซอินโดล-2-*เมตา*-เฟนิลบอโรนิค แอซิด (1-cyanoisoindole-2-*m*-phenylboronic acid) ซึ่งเตรียมได้จาก*ออร์โธ*-แพททาลาดีไฮด์ (*o*-phthalaldehyde) และ*เมตา*-อะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (*m*-aminophenylboronic acid) ปฏิกิริยาการทำอนุพันธ์ของบราสสิโนสเตียรอยด์ กับรีเอเจนต์จะทำในสารละลายผสมของอะซิโตไนไทรล์ที่มีไพริดีนอยู่ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ แล้วทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น คือ 330 นาโนเมตร (λ_{ex}) และความยาวคลื่นที่สารคายแสงที่ 400 นาโนเมตร (λ_{em}) ใช้รีเวิร์สเฟสคอลัมน์ STR ODS-H (เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.0 มิลลิเมตรx150 มิลลิเมตร) เป็นเฟสคงที่ (Stationary phase) โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตไนไทรล์ กับกรดแอซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ (CH_3CN: 1% CH_3COOH) ในอัตราส่วน 90: 10 ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) พบว่าอนุพันธ์ของบราสสิโนสเตียรอยด์ กับ

รีเอเจนต์บอโรเนต มีขีดจำกัดการตรวจวัดที่ 20 พิโคกรัม (S/ N = 3) นอกจากนี้รีเอเจนต์ที่ศึกษามีข้อดี คือ มีสภาพไวในการวิเคราะห์สูง เมื่อเทียบกับอนุพันธ์ของกรดบอโรนิคชนิดอื่นที่นิยมใช้ เช่น 9-ฟีแนนทรีนบอโรนิก แอซิด (9-phenanthreneboronic acid) และมีความเฉพาะเจาะจงในการทำปฏิกิริยาสูง คือ ทำปฏิกิริยาที่หมู่ 1,2-ไดออล (1,2-diol group)

Gamoh, Okamoto, Takatsuto, and Tejima (1990) ได้สังเคราะห์รีเอเจนต์ตัวใหม่ สำหรับใช้วิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งมีตัวตรวจวัดเป็นเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ รีเอเจนต์ตัวนี้ คือ *เมตา*-แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (*m*-dansylaminophenylboronic acid, DABA) การเตรียมอนุพันธ์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรเนต (Dansylaminophenylboronates) ทำได้โดยนำรีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 10 มิลลิกรัม ละลายใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ของไพริดีนในอะซิโตไนไทรล์ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ที่สกัดจากเกสรพืช ปิดฝาหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน และนำไปให้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตั้งสารละลายผสมให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่มีตัวตรวจวัดเป็นเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ ค่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น คือ 345 นาโนเมตร (λ_{ex}) และค่าความยาวคลื่นที่สารคายแสงที่ 515 นาโนเมตร (λ_{em}) ใช้รีเวิร์สเฟสคอลัมน์ Shim-pack CLC-ODS (M) (เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตรx150 มิลลิเมตร) เป็นเฟสคงที่ (Stationary phase) โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตไนไทรล์ กับน้ำ (CH_3CN: H_2O) ในอัตราส่วน 80: 20 ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) จากการวิเคราะห์ พบว่ารีเอเจนต์ตัวใหม่นี้ ให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด เท่ากับ 25 พิโคกรัมของสารมาตรฐานบราสสิโนไลด์ (S/ N = 2) ซึ่งดีกว่ารีเอเจนต์แนพทาลีนบอโรนิค แอซิด (Naphthaleneboronic acid) ที่ให้อนุพันธ์เป็นแนพทาลีนบอโรเนต (Naphthaleneboronate)

Takatsuto, Omote, Gamoh, and Ishibashi (1990) ได้ทำการแยก และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของฮอร์โมนบราสสิโนไลด์ และแคสตาสเตอโรน ในเกสรของเมล็ดพืชขนาดเล็กสีเข้ม (Buckwheat) โดยวิธีวัดการเจริญเติบโตของเมล็ดข้าวส่วนที่งอก (Rice lamina inclination) นำเกสรของเมล็ดพืชขนาดเล็กสีเข้ม (Buckwheat) มาสกัดด้วยเมทานอล และเติมตัวทำละลายผสมของคลอโรฟอร์ม และเมทานอล (1: 1, ปริมาตรโดยปริมาตร) ลงไป จากนั้นนำของผสมไประเหยตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ได้มาทำการพาร์ทิชันด้วยตัวทำละลายผสมของเฮกเซน และเมทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ (1: 1, ปริมาตรโดยปริมาตร) ระเหยตัวทำละลายของสารสกัดในชั้นของเมทานอลออก และนำสารสกัดที่ได้มาทำการพาร์ทิชันต่อด้วยตัวทำละลาย

คลอโรฟอร์ม และสารละลายอิ่มตัวของโซเดียม ไฮโดรเจน คาร์บอเนต และทำการแยกฮอร์โมนที่สกัดได้ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคพรีพาเรทีฟ ทิน เลเยอร์ โครมาโทกราฟี (*p*-TLC) แล้วจึงนำมาทำอนุพันธ์กับรีเอเจนต์ 9-ฟีแนนทรีนบอโรนิค แอซิด (9-phenanthreneboronic acid) และรีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (Dansylaminophenylboronic acid) ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำการตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่มีตัวตรวจวัดเป็นฟลูออเรสเซนซ์ ค่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น และค่าความยาวคลื่นที่สารคายแสงตรวจวัดที่ 305 นาโนเมตร (λ_{ex}) 375 นาโนเมตร (λ_{em}) และ 345 นาโนเมตร (λ_{ex}) 515 นาโนเมตร (λ_{em}) ของบราสสิโนไลด์ และแคสตาสเตอโรน ตามลำดับ ปริมาณของบราสสิโนไลด์ และแคสตาสเตอโรน ที่ตรวจวัดได้ เท่ากับ 5.0 และ 7.1 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ จากนั้นทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของบราสสิโนไลด์ และแคสตาสเตอโรน ในเกสรของเมล็ดพืชขนาดเล็กสีเข้ม (Buckwheat) ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี คือ แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี พบว่ามีโมเลกุลลาร์ไอออนของสารอนุพันธ์แคสตาสเตอโรน *บิส*-มีเทนบอโรเนต (Castasterone *bis*-methaneboronate) ที่มวล/ประจุ 512.3842 และสารอนุพันธ์บราสสิโนไลด์ *บิส*- มีเทนบอโรเนต (Brassinolide *bis*-methaneboronate) ที่มวล/ประจุ 528.3791 ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าในเกสรของเมล็ดพืชขนาดเล็กสีเข้ม (Buckwheat) มีฮอร์โมนพืชที่ใช้ในการศึกษาทั้งสองชนิด

Winter, Schneider, Meyenburg, Strack, and Adam (1999) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนบราสสิโนสเตียรอยด์ โดยการเกิดอนุพันธ์ 2 ชนิด (Double-derivatized brassinosteroids) ชนิดแรกเป็นการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฮอร์โมนบราสสิโนสเตียรอยด์ กับแดนซิลไฮดราซีน ที่อุณหภูมิห้อง และตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์เป็นเวลา 1 คืน จะได้อนุพันธ์แดนซิลไฮดราโซน จากนั้นฮอร์โมนที่เหลือจะนำมาทำให้เป็นเบสโดยการเติมไพริดีนก่อนไปทำปฏิกิริยากับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ได้อนุพันธ์เป็นแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรเนต นำอนุพันธ์ทั้งสองชนิดนี้ไปฉีดผ่านคอลัมน์ LiChrospher 100 RP18 ของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) มีตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอล และน้ำ (CH_3OH: H_2O) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เพื่อแยกฮอร์โมนทั้งหมดออกจากสารอื่นในตัวอย่าง รวมทั้งรีเอเจนต์ที่ใช้ในการเกิดอนุพันธ์ด้วย และใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตไนไทรล์ กับน้ำ (CH_3CN: H_2O) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เพื่อแยกฮอร์โมนแต่ละตัวออกจากกันที่รีเทนชันไทม์ต่าง ๆ กัน ตรวจวัดปริมาณโดยใช้ฟลูออเรสเซนซ์เป็นตัวตรวจวัด ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น คือ 230 นาโนเมตร และความยาวคลื่นที่สารคายแสง 515 นาโนเมตร วิธีวิเคราะห์นี้สามารถตรวจวัดปริมาณของฮอร์โมนกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ที่ศึกษาได้

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

Pachthong, Supyen, Buddhasukh, and Jatisatienr (2006) ได้ศึกษาการแยก และพิสูจน์เอกลักษณ์ของบราสสิโนไลด์ และแคสตาสเตอโรน ในเกสรดอกฟักทอง (*Cucurbita moschata Duch.*) โดยนำเกสรดอกฟักทองแห้งมาสกัดด้วยเมทานอล แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารสกัดที่ได้มาทำพาร์ทิชันระหว่างน้ำ และคลอโรฟอร์ม โดยส่วนที่อยู่ในชั้นคลอโรฟอร์มจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งทดสอบด้วยวิธีวัดการเจริญเติบโตของเมล็ดข้าวส่วนที่งอก (Rice lamina inclination) นำสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมาทำให้บริสุทธิ์ แล้วจึงทำอนุพันธ์กับรีเอเจนต์เมทิลบอโรนิค แอซิด (Methylboronic acid) เกิดผลิตภัณฑ์เป็นบราสสิโนไลด์ *บิส*-มีเทนบอโรเนต (Brassinolide *bis*-methaneboronate) และแคสตาสเตอโรน *บิส*-มีเทนบอโรเนต (Castasterone *bis*-methaneboronate) ตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี เพื่อแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบที่ได้ทั้งสองชนิด จากผลการวิเคราะห์สามารถระบุได้ว่ามีแคสตาสเตอโรน และบราสสิโนไลด์ เท่ากับ 112 และ 36 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักเกสรดอกฟักทองแห้ง ตามลำดับ และนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ไปใช้ประโยชน์สำหรับการเลือกวัตถุดิบในการผลิตฮอร์โมนพืชจากธรรมชาติ ซึ่งมีราคาถูก และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางเกษตรกรรมได้จริง

Huo et al. (2012) ได้นำเสนอรีเอเจนต์ชนิดใหม่ คือ 2-โบรโมไพริดีน-5-บอโรนิค แอซิด (2-bromopyridine-5-boronic acid, BPBA) ที่ใช้ในการทำอนุพันธ์กับบราสสิโนสเตียรอยด์ทั้ง 3 ชนิด คือ 24-อีพิบราสสิโนไลด์ 28-โฮโมบราสสิโนไลด์ และ 28-อีพิโฮโมบราสสิโนไลด์ ปฏิกิริยาการทำอนุพันธ์สามารถทำได้ง่าย เพียงการเขย่าสารละลายผสมให้เกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วยมือที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นวิเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค Ultra High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Triple Quadrupole Mass Spectrometry (UHPLC-ESI-QqQ-MS) ฉีดผ่านคอลัมน์ Acquity UPLC™ BEH C 18 (1.7 ไมโครเมตร, 2.1 มิลลิเมตรx100 มิลลิเมตร) ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตไนไทรล์ กับน้ำ (CH_3CN: H_2O) ผสมกับกรดฟอร์มิก 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) รูปแบบการชะแบบแกรเดียน 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 ช่วงความเป็นเส้นตรงมีค่าอยู่ในช่วง 10-10,000 นาโนกรัมต่อลิตร ค่าร้อยละการได้กลับคืนของฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ มีค่าอยู่ในช่วง 76.9-86.1 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีวิเคราะห์ที่นำเสนอขึ้นใหม่นี้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างสูง เนื่องจากใช้ตัวอย่างพืช *A.thaliana* เพียง 2 กรัมเท่านั้น แต่สามารถทำการหาปริมาณของฮอร์โมนกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ได้ โดยมีค่า

337472

เท่ากับ 0.055 นาโนกรัมต่อกรัม และ 0.070 นาโนกรัมต่อกรัม สำหรับ 24-อีพิบราสสิโนไลด์ และ 28-อีพิโฮโมบราสสิโนไลด์ ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University