บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องสเปกโทรฟลูออโรโฟโตมิเตอร์ (Spectrofluorophotometer) รุ่น FP-6200 บริษัท Jasco ประเทศญี่ปุ่น และคิวเวตขนาด 1.5 มิลลิลิตร

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

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

3.1.4 ตู้อบ (Oven) รุ่น 1375 FX ของ SHEL LAB, Sheldon manufacturing, INC.

3.1.5 ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 0.1-10 ไมโครลิตร, 10-100 ไมโครลิตร และ 100-1,000 ไมโครลิตร บริษัท Boeco ประเทศเยอรมัน

3.2 สารเคมี

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

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

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

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

3.2.5 โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogenphosphate: KH_2PO มวลโมเลกุล 136.09 กรัมต่อโมล) เกรดวิเคราะห์ ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี

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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.2.7 ไดเมทิลซัลฟอกซ์ไซด์ (Dimethylsulfoxide: C_2H_6OS มวลโมเลกุล 78.13 กรัมต่อโมล) เกรดสำหรับการสังเคราะห์ ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

3.2.8 กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์ (Hydrochloric acid: HCl มวลโมเลกุล 36.46 กรัมต่อโมล) เกรดวิเคราะห์ ของบริษัท RCI Labscan ประเทศไทย

3.2.9 เอทิล แอซิเตท (Ethyl acetate: $C_4H_8O_2$ มวลโมเลกุล 88.11 กรัมต่อโมล) เกรดวิเคราะห์ ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

3.3 การเตรียมสารละลาย

3.3.1 สารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์

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

3.3.2 สารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (DABA)

ชั่งแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 11.11, 4.44 และ 2.50 มิลลิกรัม ละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกซ์ไซด์ ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร จะได้ DABA 6.00, 2.40 และ 1.35 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (เตรียมก่อนใช้) จากนั้นนำ DABA 6.00 มิลลิโมลาร์ ไปเจือจางด้วยไดเมทิลซัลฟอกซ์ไซด์ เป็นความเข้มข้นต่าง ๆ ตามต้องการ

3.3.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

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

3.3.4 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก

ตวงกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4.2 มิลลิลิตร เทลงในน้ำปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.0 โมลาร์ จากนั้นนำไปเจือจางเป็นสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.10 โมลาร์ ปริมาตรตามที่ต้องการ

3.3.5 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

3.3.6 สารละลายบัฟเฟอร์ไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคะไฮเดรต 10 มิลลิโมลาร์

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

3.3.7 สารละลายน้ำตาล 100 มิลลิโมลาร์

ชั่งน้ำตาลทรายแดง และน้ำตาลอ้อย อย่างละ 0.6846 กรัม ลงในบีกเกอร์ใบที่ 1-2 ตามลำดับ จากนั้นละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 20 มิลลิลิตร

3.3.8 สารละลายกากน้ำตาล

ชั่งกากน้ำตาล 1.3692 กรัม ลงในบีกเกอร์ จากนั้นละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 40 มิลลิลิตร

3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์

ปฏิกิริยาระหว่างบราสสิโนไลด์ และแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด มีตัวแปรที่ศึกษา ดังนี้คือ ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น (Excitation wavelength, λ_{ex}) ความยาวคลื่นที่สารคายแสง (Emission wavelength, λ_{em}) ค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ อุณหภูมิ ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา และความเข้มข้นของสารละลายรีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด จากนั้นจึงนำสภาวะที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์รวม โดยเทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ และปุ๋ยน้ำ

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

ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์ มา 750 ไมโครลิตร และสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 2.4 มิลลิโมลาร์ มา 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิเปตต์สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 ลงไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

650 ไมโครลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปสแกนหา λ_{ex} และ λ_{em} ด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรโฟโตมิเตอร์ ใช้ความกว้างของช่องแสงการกระตุ้น (Excitation slit width) และความกว้างของช่องแสงการคายแสง (Emission slit width) ที่ 10 และ 5 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยเริ่มต้นตั้ง λ_{ex} ชั่วคราวไว้ที่ 230 นาโนเมตร แล้วสแกนสเปกตรัมการคายแสงของสารละลายตัวอย่าง จะทำให้ได้ λ_{em} ชั่วคราว จากนั้นใช้ λ_{em} ชั่วคราวที่หาได้ สแกนสเปกตรัมการกระตุ้นของสารละลายตัวอย่าง จะทำให้ทราบ λ_{ex} ของสารละลายตัวอย่างที่แท้จริง ใช้ λ_{ex} แท้จริงที่ได้มาสแกนสเปกตรัมการคายแสงของสารละลายตัวอย่าง จะทำให้ทราบ λ_{em} ที่ถูกต้อง

3.4.2 ค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายผสม และทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 โดยปิเปตต์สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 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

3.4.3 ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายผสม และทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 โดยในหลอดที่ 1-4 ปรับปริมาตรสารละลายผสมด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในช่วงความเข้มข้น 0.1-10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และปรับปริมาตรสารละลายผสมด้วยน้ำปราศจากไอออน 650 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 5

3.4.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

เตรียมสารละลายผสม และทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 แต่นำสารละลายผสมไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

3.4.5 ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

เตรียมสารละลายผสม และทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 โดยตั้งสารละลายผสมให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 และ 70 นาที ตามลำดับ

3.4.6 ความเข้มข้นของสารละลายแคนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด

เตรียมสารละลายผสม และทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 แต่ปิเปตต์สารละลายแคนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 0.15, 0.45, 0.75, 1.05, 1.35, 1.50, 2.40, 3.00, 4.50 และ 6.00 มิลลิโมลาร์ มาอย่างละ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1-10 ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.5 การประเมินประสิทธิภาพของวิธี (Evaluation of method performance)

การประเมินประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับการหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ โดยเทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ด้วยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมทรี โดยปัจจัยที่ต้องทำการศึกษา ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง กราฟมาตรฐาน ขีดจำกัดการตรวจวัด ขีดจำกัดการหาปริมาณ ความเที่ยง ผลของน้ำตาลต่อการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ และค่าร้อยละการได้กลับคืน

3.5.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 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 โดยในแต่ละหลอดมีสารละลายแคนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิคแอซิด 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

3.5.2 กราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

เตรียมสารละลายผสม และทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.5.1 แต่ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์ มา 15, 75, 150, 300, 450, 600 และ 750 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1-7 ตามลำดับ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปทำการสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์รวม โดยเทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ต่อไป

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

ปิเปตต์สารละลายแคนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 1.35 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตต์สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 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 ($3SD/slope$) และ LOQ ($10SD/slope$)

3.5.4 ความเที่ยง (Precision)

- ความเที่ยงภายในวัน (Intra-day Precision)

ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์ มา 75, 150 และ 600 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1-3 ตามลำดับ โดยในแต่ละหลอดมีสารละลายแคนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 1.35 มิลลิโมลาร์ 100 ไมโครลิตรบรรจุอยู่ จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดบอกปริมาตรที่ 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, *% RSD*)

- ความเที่ยงระหว่างวัน (Inter-day Precision)

เตรียมสารละลายผสม และทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ความเที่ยงภายในวัน โดยเตรียมสารสารละลายผสมใหม่ และวิเคราะห์ทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation, *% RSD*)

3.5.5 ผลของน้ำตาลต่อการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์

- ผลของน้ำตาลต่อการทำปฏิกิริยากับแคนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด

ปิเปตต์สารละลายน้ำตาลทรายแดง และน้ำตาลอ้อย 100 มิลลิโมลาร์ และสารละลายกากน้ำตาล มาอย่างละ 15, 60, 100, 300, 600 และ 900 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1-18 ตามลำดับ โดยในแต่ละหลอดมีสารละลายแคนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค 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

ปิเปตต์สารละลายน้ำตาลทรายแดง และน้ำตาลอ้อย 100 มิลลิโมลาร์ และสารละลายกากน้ำตาล มาอย่างละ 600 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1-3 ตามลำดับ จากนั้นปิเปตต์สารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์ 150 ไมโครลิตร และสารละลายแคนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 1.35 มิลลิโมลาร์ 100 ไมโครลิตร ใส่ตามลงไปทุกหลอด สุดท้ายปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดบอกปริมาตรที่ 1.5 มิลลิลิตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชเท่ากับ 7 เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา

เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ ที่ λ_{ex} 380 นาโนเมตร และ λ_{em} 505 นาโนเมตร

3.5.6 การหาค่าร้อยละการได้กลับคืน (% Recovery)

ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ ได้รับความอนุเคราะห์มาจากบ้านญาติของผู้ทำวิจัยใน อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ซึ่งเตรียมขึ้นจากพืชท้องถิ่น (การเตรียมน้ำหมักชีวภาพ แสดงดังภาคผนวก ก) และตัวอย่างปุ๋ยน้ำ ซื้อมาจากร้านขายเคมีภัณฑ์ ในอำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี และในอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี จากนั้นจึงทำการทดสอบโดยการหาค่าร้อยละการได้กลับคืนในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ และตัวอย่างปุ๋ยน้ำ โดยทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 22 ตัวอย่าง จำแนกเป็นตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ 18 ตัวอย่าง และตัวอย่างปุ๋ยน้ำ 4 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ความเข้มข้น ดังนี้

- ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ

กรองตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และปิเปตต์ตัวอย่างมา 200-700 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับสี และความเข้มข้นของตัวอย่าง หรือนำตัวอย่างที่กรองแล้วไปเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนในอัตราส่วน 1: 2-1: 10 ก่อนที่จะปิเปตต์มาทำปฏิกิริยา จากนั้นปิเปตต์สารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์ ที่ 4 ระดับ ความเข้มข้นระหว่าง 0-4 เท่าของความเข้มข้นของบราสสิโนไลด์ที่มีอยู่ในตัวอย่างเริ่มต้น และปิเปตต์สารละลายรีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 1.35 มิลลิโมลาร์ มา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดบอกปริมาตรที่ 1.5 มิลลิลิตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชเท่ากับ 7 เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่ λ_{ex} 380 นาโนเมตร และ λ_{em} 505 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาค่าร้อยละการได้กลับคืนของฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์รวม โดยเทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ (% Recovery)

- ตัวอย่างปุ๋ยน้ำ

ปิเปตต์ตัวอย่างปุ๋ยน้ำ หรือปุ๋ยน้ำที่เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนในอัตราส่วน 1: 40 หรือ 1: 100 มา 20-400 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับสี และความเข้มข้นของตัวอย่าง ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปิเปตต์สารละลาย และทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ

3.6 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR-Spectroscopy)

ตวงน้ำหมักชีวภาพ หรือปุ๋ยน้ำ 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร นำไประเหยแอลกอฮอล์ออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) เป็นเวลา 15 นาที และให้ความร้อนแก่ตัวอย่าง โดยการปรับอุณหภูมิของอ่างน้ำที่ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเทสารตัวอย่างที่ผ่านการระเหยแอลกอฮอล์ออกจากขวดก้นกลม ลงในกรวยแยกสาร ทิ้งสารละลายให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมเอทิล แอซิเตท 20 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อทำการสกัด เขย่าสารละลายในกรวยแยก ทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น เก็บสารละลายในชั้นของเอทิล แอซิเตท ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมสารละลายในชั้นเอทิล แอซิเตท ทั้ง 3 ครั้งที่ได้เข้าด้วยกัน แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกจนแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) และนำสารตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR-spectroscopy)

3.7 การวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์ในตัวอย่าง

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองการหาค่าร้อยละการได้กลับคืนมาคำนวณหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ในตัวอย่างต่าง ๆ ด้วยวิธี Standard Addition โดยการสร้างกราฟระหว่างค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ที่เติม จากนั้นแทนค่า y = 0 ลงในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ แล้วหาค่า x ก็จะทำให้ทราบปริมาณของฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ในตัวอย่างได้