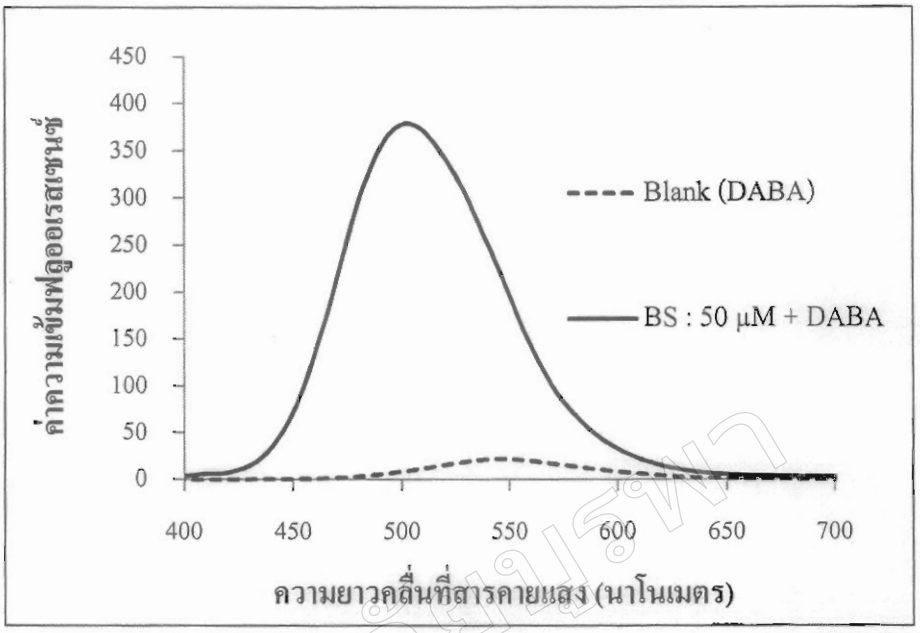
บทที่ 4
ผล และอภิปรายการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์รวม โดยเทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ในน้ำหมักชีวภาพ และปุ๋ยน้ำ ด้วยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมทรี ซึ่งอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างบราสสิโนไลด์ กับรีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ ผลการศึกษามีสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา ผลการศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของวิธี ผลการวิเคราะห์สารตัวอย่างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี และผลการวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์ในตัวอย่าง

4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์

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

เมื่อนำสารละลายผสมของสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 50 ไมโครโมลาร์ กับสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 160 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ไปสแกนหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสม พบว่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น (λ_{ex}) และความยาวคลื่นที่สารคายแสง (λ_{em}) เท่ากับ 380 นาโนเมตร และ 505 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยใช้ความกว้างของช่องแสงการกระตุ้น (Excitation slit width) และความกว้างของช่องแสงการคายแสง (Emission slit width) ที่ 10 และ 5 นาโนเมตร ตามลำดับ ดังภาพที่ 4-1 โดยที่ความยาวคลื่นทั้งสองนี้จะให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่สูงกว่าที่ความยาวคลื่นอื่น ๆ และมีค่าผลต่างของค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายผสมบราสสิโนไลด์ และสารละลายแบลงค์สูงสุด ซึ่งความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์นี้มีความคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Gamoh, Okamoto, Takatsuto, and Tejima (1990) ที่ได้ทำการสังเคราะห์รีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด สำหรับใช้ในการทำอนุพันธ์กับฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ และทำการตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งมีตัวตรวจวัดเป็นเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ ค่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น คือ 345 นาโนเมตร (λ_{ex}) และค่าความยาวคลื่นที่สารคายแสงที่ 515 นาโนเมตร (λ_{em})

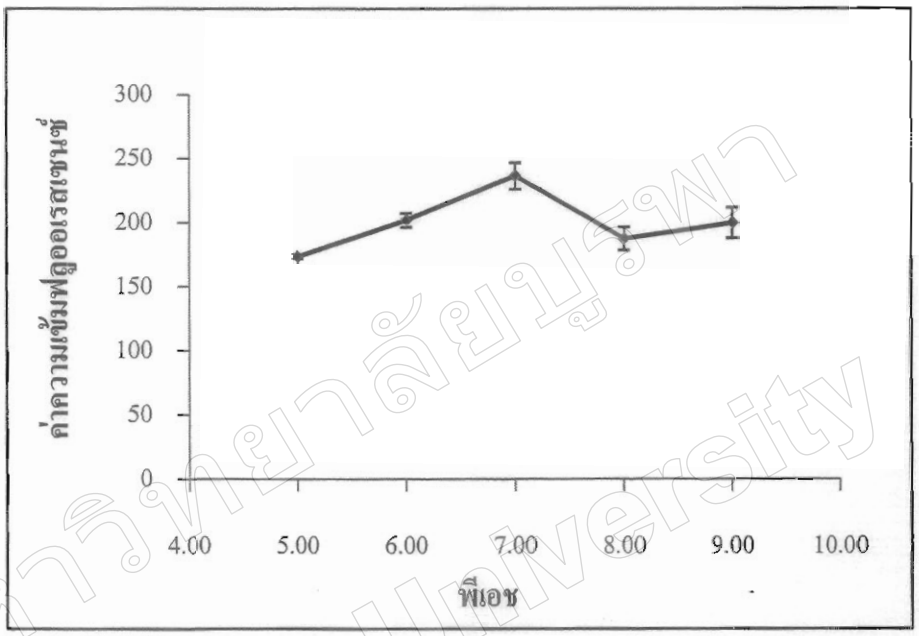


ภาพที่ 4-1 ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมของสารละลายบราสสิโนไลด์ที่ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (ความกว้างของช่องแสงการกระตุ้นและความกว้างของช่องแสงการคายแสง ที่ 10 และ 5 นาโนเมตร ตามลำดับ)

4.1.2 พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์

เมื่อใช้สารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 50 ไมโครโมลาร์ ผสมกับสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 160 ไมโครโมลาร์ ปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ กัน ในช่วงพีเอช 5-9 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ผลการทดลองดังภาพที่ 4-2 พบว่าค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม คือ 7 เนื่องจากเมื่อสารละลายบัฟเฟอร์มีค่าพีเอชต่ำกว่า หรือสูงกว่า 7 จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด กล่าวคือ ในกรณีที่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีค่าพีเอชต่ำกว่า 7 โปรตอนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการโปรโตเนต (Protonated) ของอะตอมไนโตรเจนที่หมู่ไดเมทิลลามีน และหมู่ซัลโฟนาไมด์ รวมทั้งหมู่ไฮดรอกซิลในส่วนของกรดบอโรนิค ในโครงสร้างของแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิดได้ ทำให้อิเล็กตรอนเกิดการเรโซแนนซ์ได้น้อยลง ต้องใช้พลังงานในการกระตุ้นอิเล็กตรอนมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการเลื่อน (Shift) ของพีกสารผลิตภัณฑ์ และทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์มีค่าลดลง ที่ 505 นาโนเมตร และในกรณีที่สารละลายบัฟเฟอร์มีค่าพีเอชสูงกว่า 7 โครงสร้างของรีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด จะเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น โดยโปรตอนที่หมู่ไฮดรอกซิลในส่วนของกรดบอโรนิคจะถูกดึงออกไป (Deprotonated) เกิดเป็นประจุ

ลบที่อะตอมของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนเกิดการเรโซแนนซ์ได้มากขึ้น จึงใช้พลังงานในการกระตุ้นอิเล็กตรอนน้อยลง ซึ่งส่งผลให้พีกของสารผลิตภัณฑ์เกิดการเลื่อน (Shift) และทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ลดลงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร



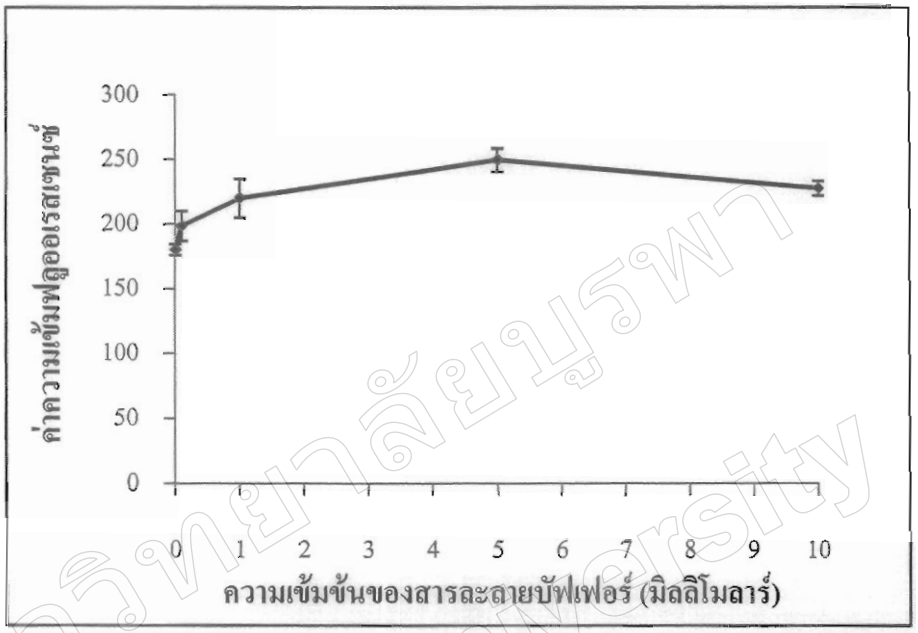
ภาพที่ 4-2 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่พีเอชต่างกัน

4.1.3 ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์

ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ มีผลต่อค่า Ionic strength และค่า pK_a ที่จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ตามลำดับ ถึงแม้ว่าอัตราส่วนความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์จะมีค่าคงที่ก็ตาม (Perrin & Dempsey, 1974) ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องศึกษา งานวิจัยนี้ได้ใช้สารละลายโพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ผสมกับสารละลายไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคะไฮเดรต เตรียมบัฟเฟอร์พีเอช 7 เข้มข้นระหว่าง 0.1-10 มิลลิโมลาร์ เป็นสารละลายปรับปริมาตร โดยผสมสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 50 ไมโครโมลาร์ กับสารละลายแคนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 160 ไมโครโมลาร์ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4-3 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ก็มีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงที่ 5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์เริ่มลดลงเล็กน้อย ซึ่งอาจจะเป็นผลของ Ionic strength ดังที่กล่าวมาแล้วหรือเป็นผลจากฟอสเฟตไอออนที่เป็น Quencher ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีปริมาณมากเกินพอ ซึ่งทำให้เกิด Fluorescence

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

quenching ขึ้นได้ ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารละลายปรับปริมาตรคือ 5 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 4-3 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ต่างกัน

4.1.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

อุณหภูมิมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ ในเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ กล่าวคือ อุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นจะเกิดกระบวนการไม่แผ่รังสี (Non-radiative processes) ทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ลดลง (Valeur, 2001) โดยมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ ใช้การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่างฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ กับแคนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ที่ 70 องศาเซลเซียส (Gamoh, Okamoto, Takatsuto, & Tejima, 1990) นอกจากนั้นยังมีงานวิจัยอื่น ๆ ที่ใช้อุณหภูมิห้อง สำหรับการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่างแซ็กคาไรด์ กับรีเอเจนต์แคนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (Luis, Granda, Badia, & Diaz-Garcia, 1998; Peng & Qin, 2008; Seckin, 2004) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาอุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา โดยใช้สารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 50 ไมโครโมลาร์ ผสมกับสารละลายฟลูออโรฟอร์รีเอเจนต์แคนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 160 ไมโครโมลาร์ และใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 7 เป็นสารละลายปรับปริมาตร ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ในช่วง 25-90 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4-4 พบว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่างบราสสิโนไลด์ และแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด เพื่อความสะดวก และง่ายต่อการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ โดยการเพิ่มอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่สูงกว่า 40 องศาเซลเซียส จะส่งผลให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ลดลง ตามลำดับ

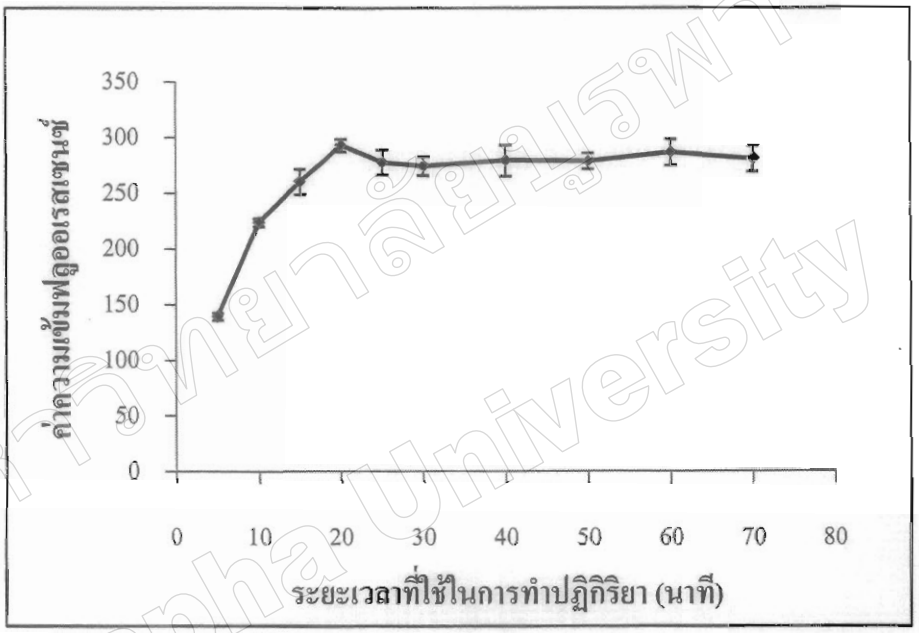
ภาพที่ 4-4 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างกัน

4.1.5 ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

ทำการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาของสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 50 ไมโครโมลาร์ และสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 160 ไมโครโมลาร์ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอชเท่ากับ 7 เป็นสารละลายปรับปริมาตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในช่วงระยะเวลา 5-70 นาที ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4-5 พบว่าหลังจากเวลาผ่านไป 20 นาที การตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทำอนุพันธ์จะมีค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่สูงสุด และจะมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 25 นาที จากนั้นค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์จะมีค่าคงที่ไปเรื่อย ๆ ถึงแม้ว่าจะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานถึง 70 นาทีก็ตาม จึงกล่าวได้ว่าสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำอนุพันธ์มีความเสถียรที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน ดังนั้นเวลาที่ 20 นาที จึงมีความเหมาะสมที่จะเลือกใช้ใน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การทำปฏิกิริยา เนื่องจากให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สูงสุด ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Takatsuto, Omote, Gamoh, and Ishibashi (1990) และ Winter, Schneider, Meyenburg, Strack, and Adam (1999) ที่ได้ทำการหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับรีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีเช่นเดียวกัน



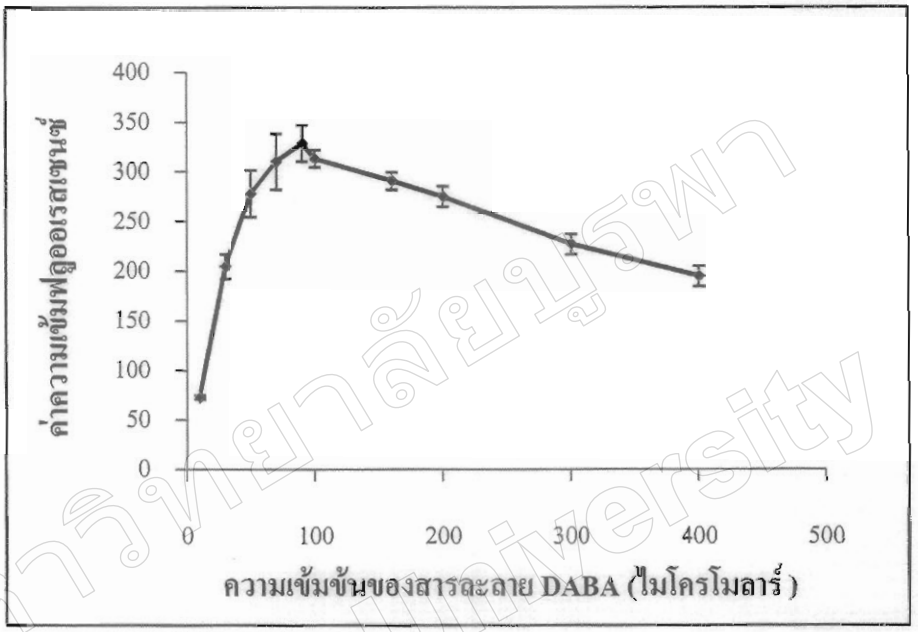
ภาพที่ 4-5 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อทำปฏิกิริยาที่ระยะเวลาต่างกัน

4.1.6 ความเข้มข้นของสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด

เมื่อนำสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 50 ไมโครโมลาร์ ทำปฏิกิริยากับสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ในช่วงความเข้มข้น 10-400 ไมโครโมลาร์ ปรับปริมาตรสารละลายผสมด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4-6 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของรีเอเจนต์มากขึ้นจะทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์มีค่าเพิ่มขึ้นตามไปด้วยจนถึงที่ 90 ไมโครโมลาร์ จากนั้นค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ก็จะมีค่าลดลงเรื่อย ๆ อันเนื่องมาจากเมื่อใช้รีเอเจนต์ในการทำอนุพันธ์ในปริมาณที่มากเกินไป ก็จะมีโมเลกุลของรีเอเจนต์ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาอยู่ ซึ่งโมเลกุลของฟลูออโรฟอร์รีเอเจนต์ที่เหลืออยู่นี้สามารถให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ได้เช่นกัน และส่งผลรบกวนต่อการวิเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร เกิดปรากฏการณ์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Fluorescence quenching ขึ้น ทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์มีค่าลดลง ดังนั้น ค่าความเข้มข้นของสารละลายแคนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ที่ 90 ไมโครโมลาร์ จึงถูกเลือกใช้ในการทำอนุพันธ์กับบราสสิโนไลด์ต่อไป

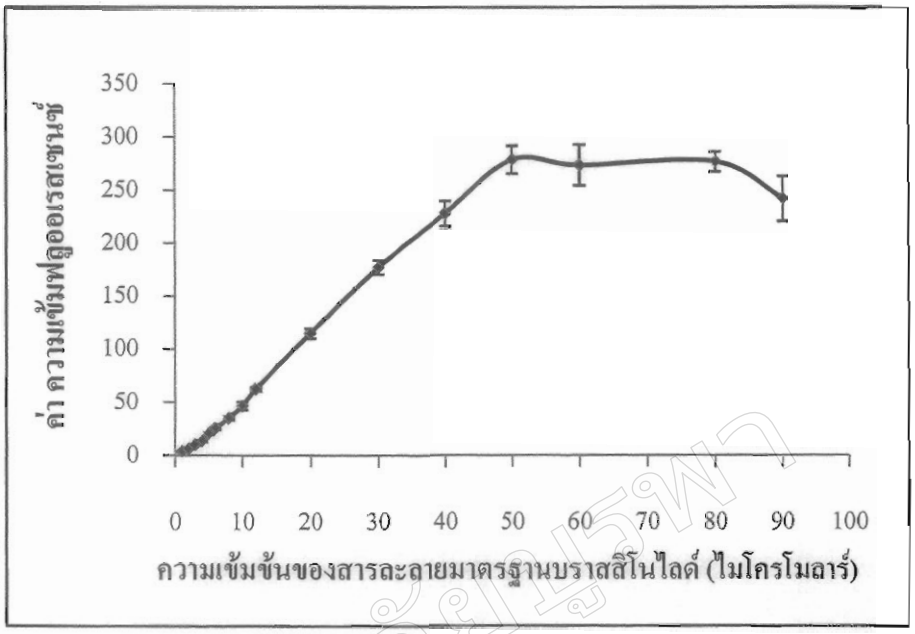


ภาพที่ 4-6 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ความเข้มข้นของสารละลายแคนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิดต่างกัน

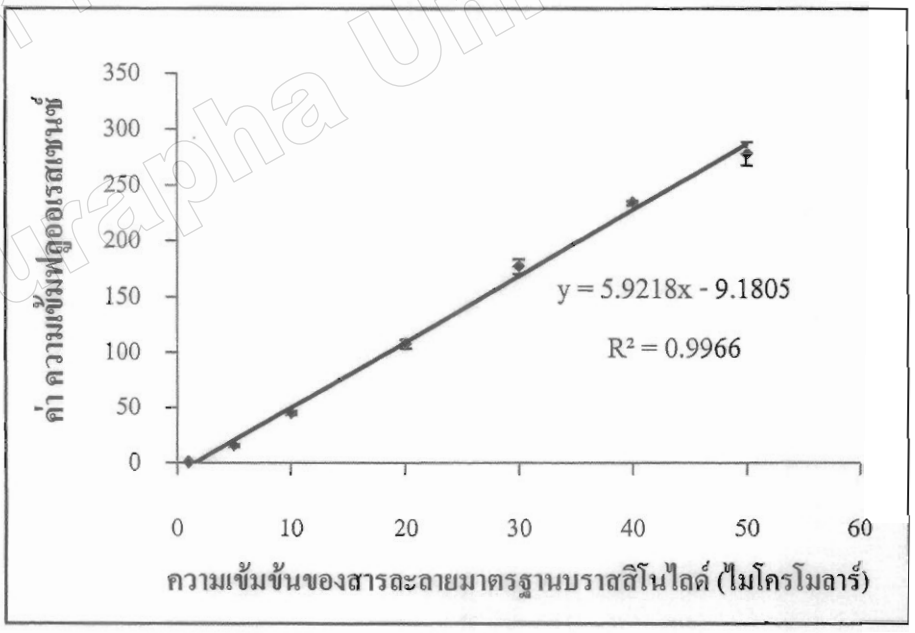
4.2 การประเมินประสิทธิภาพของวิธี (Evaluation of method performance)

วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) อยู่ระหว่าง 1-50 ไมโครโมลาร์ ดังภาพที่ 4-7 เมื่อความเข้มข้นของบราสสิโนไลด์สูงขึ้น ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์จะมีค่าคงที่ จึงได้นำช่วงความเป็นเส้นตรงนี้มาสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) แสดงดังภาพที่ 4-8 ซึ่งกราฟมาตรฐานของบราสสิโนไลด์ มีสมการเส้นตรง คือ y = 5.9218x-9.1805 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9966 โดยค่าที่ได้เข้าใกล้ 1 แสดงถึงแนวโน้มที่ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานบราสสิโนไลด์ และค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์มีความเป็นเส้นตรงอย่างดี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์



ภาพที่ 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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลการศึกษาความเที่ยงภายในวัน (Intra-day Precision) และความเที่ยงระหว่างวัน (Inter-day Precision) โดยนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation หรือ *% RSD*) ผลดังตารางที่ 4-1 ที่ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 5, 10 และ 40 ไมโครโมลาร์ หรือ 2.40, 4.81 และ 19.23 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 2.00-8.42 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าวิธีการนี้มีความเที่ยงตรงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ตามมาตรฐานของ Association of Official Analytical Chemists International (1993) แสดงดังตารางที่ 1ก ในภาคผนวก ก

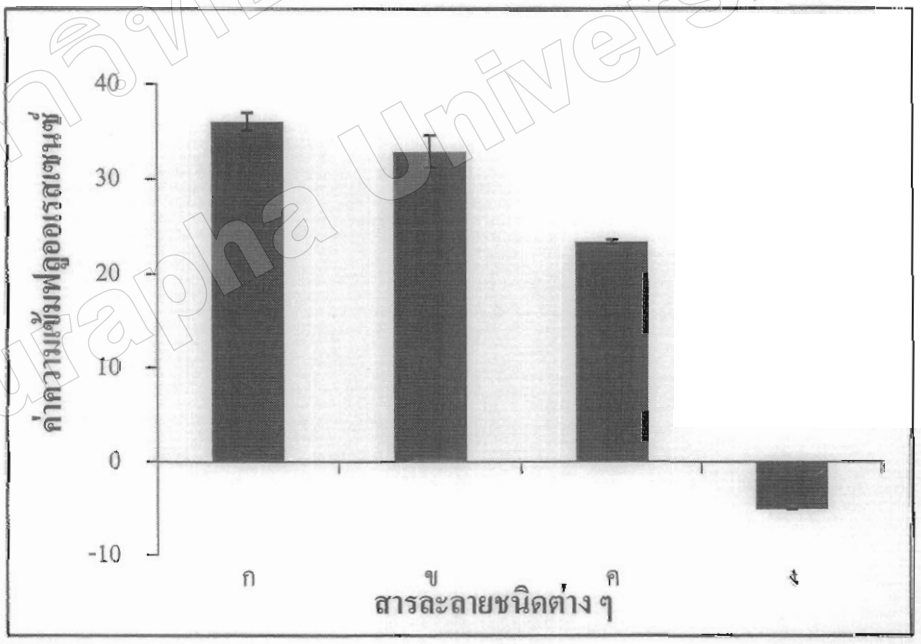
ตารางที่ 4-1 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการศึกษาความเที่ยง (n = 7)

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

- ผลของน้ำตาลต่อปฏิกิริยาอนุพันธ์

ในกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพ และการผลิตปุ๋ยน้ำจากวัตถุดิบต่าง ๆ นั้นต้องใช้น้ำตาล หรือกากน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ โดยน้ำตาลที่ใช้มี 2 ชนิด คือ น้ำตาลทรายแดง และน้ำตาลอ้อย ซึ่งน้ำตาลเหล่านี้เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (น้ำตาลซูโครส) มีโครงสร้างทางเคมีที่มีหมู่ไฮดรอกซิล อยู่ในตำแหน่งไดออล สามารถที่จะทำปฏิกิริยากับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิดได้ ดังนั้นจึงควรศึกษาผลของน้ำตาลต่อการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ โดยนำสารละลายน้ำตาลแต่ละชนิด และสารละลายกากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 1- 60 มิลลิโมลาร์ (0.022-1.3 เปอร์เซ็นต์) มาทำปฏิกิริยากับสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 90 ไมโครโมลาร์ พบว่าไม่มีสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เกิดขึ้น ซึ่งคล้ายคลึงกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่างแซ็กคาไรด์กับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (Luis, Granda, Badia, & Diaz-Garcia, 1998) ซึ่งรายงานว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ผลิตภัณฑ์ที่ลดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence quenching) และเกิดได้ดีกับเฉพาะน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวฟรุกโทส แต่จากปริมาณน้ำตาลที่ค่อนข้างสูงในตัวอย่าง งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาต่อถึงผลของน้ำตาลต่อการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ของบราสสิโนไลด์ โดยใช้สารละลายน้ำตาลแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์

(0.86 เปอร์เซ็นต์) และสารละลายกากน้ำตาล มาทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 10 ไมโครโมลาร์ และสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 90 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4-9 พบว่าค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายผสมน้ำตาลทรายแดง มีค่าลดลงเล็กน้อย แต่ในน้ำตาลอ้อย ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ลดลงมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกากน้ำตาลสัญญาณมีค่าติดลบ เนื่องมาจากสีของสารละลายน้ำตาลอ้อย และกากน้ำตาลมีความเข้มกว่าน้ำตาลทรายแดงมาก จึงบดบังการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ได้มาก ในงานวิจัยนี้สารตัวอย่างมีปริมาณบราสสิโนไลด์สูงพอ จึงแก้ไขปัญหานี้โดยการเจือจางสารตัวอย่างด้วยน้ำปราศจากไอออนที่อัตราส่วนต่าง ๆ ก่อนนำไปวิเคราะห์ กรณีอื่นถ้าเจือจางแล้วไม่สามารถตรวจพบบราสสิโนไลด์ได้ อาจจะแก้โดยกำจัดสีของสารตัวอย่างโดยการผ่านสารตัวอย่างลงไปในคอลัมน์ของสารดูดซับ (ซิลิกา) ก่อนที่จะปิเปตต์มาทำปฏิกิริยา เพื่อลดความเข้มของสีจากสารตัวอย่างที่รบกวนการวิเคราะห์



ภาพที่ 4-9 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์เมื่อผสมด้วยสารละลายชนิดต่าง ๆ กับสารมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 10 ไมโครโมลาร์

หมายเหตุ (ก) สารมาตรฐานบราสสิโนไลด์
(ข) สารมาตรฐานบราสสิโนไลด์ + น้ำตาลทรายแดง 40 มิลลิโมลาร์
(ค) สารมาตรฐานบราสสิโนไลด์ + น้ำตาลอ้อย 40 มิลลิโมลาร์
(ง) สารมาตรฐานบราสสิโนไลด์ + กากน้ำตาล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลการศึกษาค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนไลด์ ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ และปุ๋ยน้ำ จากการ spiked สารมาตรฐานบราสสิโนไลด์ ที่ 4 ระดับ ความเข้มข้นระหว่าง 0-4 เท่าของความเข้มข้นของบราสสิโนไลด์ที่มีอยู่ในตัวอย่างที่ไม่ผ่านการ spiked ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4-2 และตารางที่ 4-3 พบว่าค่าร้อยละการได้กลับคืนมีค่าอยู่ในช่วง 5.0-52.5 เปอร์เซ็นต์ และ 10.0-51.7 เปอร์เซ็นต์ ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ และปุ๋ยน้ำ ตามลำดับ ซึ่งค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างมีค่าต่ำมาก อาจเป็นเพราะเมทริกซ์ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลของบราสสิโนไลด์บางส่วน ทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจวัดได้จึงมีค่าลดลง ค่าร้อยละการได้กลับคืนจึงต่ำ โดยในการทดลองได้เพิ่มความเข้มข้นของรีเอเจนต์สำหรับการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์แล้ว แต่ผลการทดลองที่ได้ก็ไม่ต่างกัน จึงไม่ใช่ปัญหาว่ารีเอเจนต์ไม่พอสำหรับการทำปฏิกิริยา เนื่องจากความเข้มข้นของรีเอเจนต์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์นั้น มีความเข้มข้นมากกว่าสารมาตรฐานบราสสิโนไลด์ ถึง 1.8 เท่าแล้ว ดังนั้นจึงได้มีการใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี เพื่อตรวจสอบเบื้องต้นว่าในตัวอย่างมีฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์อยู่จริง ในหัวข้อถัดไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-2 ค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ (n = 3)

ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ	ความเข้มข้นของบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างที่เจือจาง (ไมโครโมลาร์)			ค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนไลด์
	ก่อนเติมสารมาตรฐาน	สารมาตรฐานที่เติมลงไป	หลังเติมสารมาตรฐาน	
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
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
ข่า	2.0	0.0	-	-
		2.0	2.4	20.0
		4.0	2.9	22.5
		8.0	4.3	28.8

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ	ความเข้มข้นของบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างที่เจือจาง (ไมโครโมลาร์)			ค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนไลด์
	ก่อนเติมสารมาตรฐาน	สารมาตรฐานที่เติมลงไป	หลังเติมสารมาตรฐาน	
ขิง	1.8	0.0	-	-
		1.0	2.0	20.0
		2.0	2.3	25.0
		4.0	3.3	37.5
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
ลองกอง	3.6	0.0	-	-
		2.0	4.4	40.0
		4.0	5.5	47.5
		8.0	7.8	52.5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-3 ค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างปุ๋ยน้ำ (n = 3)

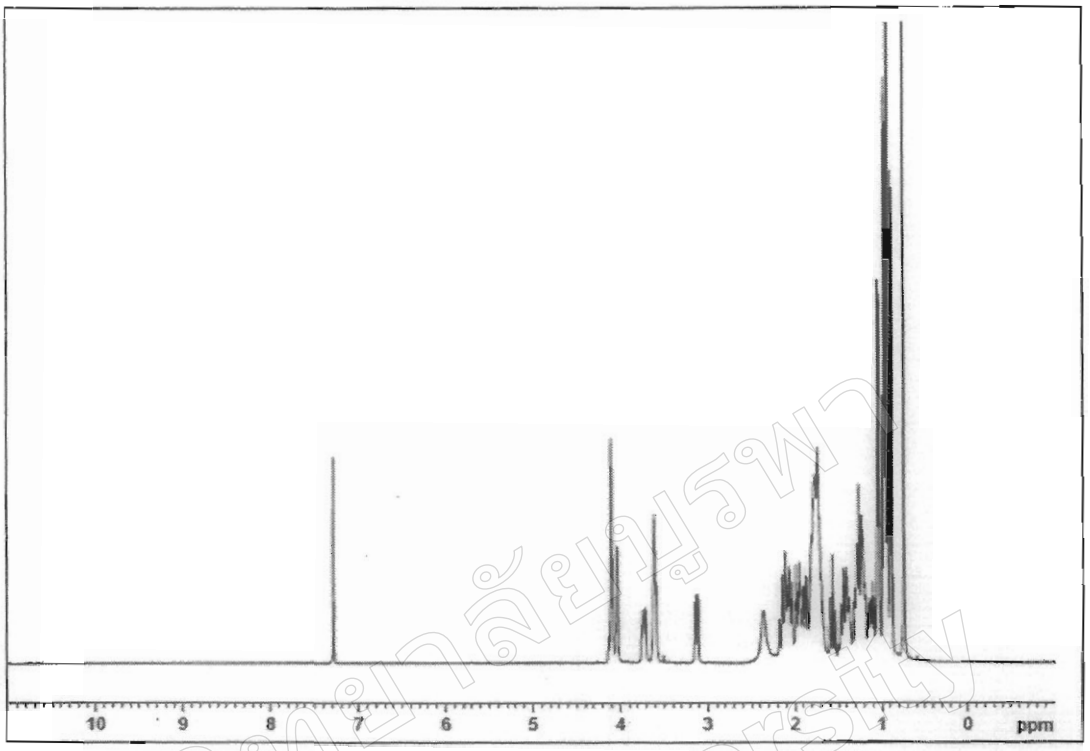
ตัวอย่างปุ๋ยน้ำ	ความเข้มข้นของบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างที่เจือจาง (ไมโครโมลาร์)			ค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนไลด์
	ก่อนเติมสารมาตรฐาน	สารมาตรฐานที่เติมลงไป	หลังเติมสารมาตรฐาน	
ก	2.2	0.0	-	-
		2.0	2.4	10.0
		4.0	2.8	15.0
		8.0	4.1	23.8
ข	3.6	0.0	-	-
		4.0	4.0	10.0
		8.0	5.2	20.0
		16.0	9.2	35.0
ค	3.1	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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

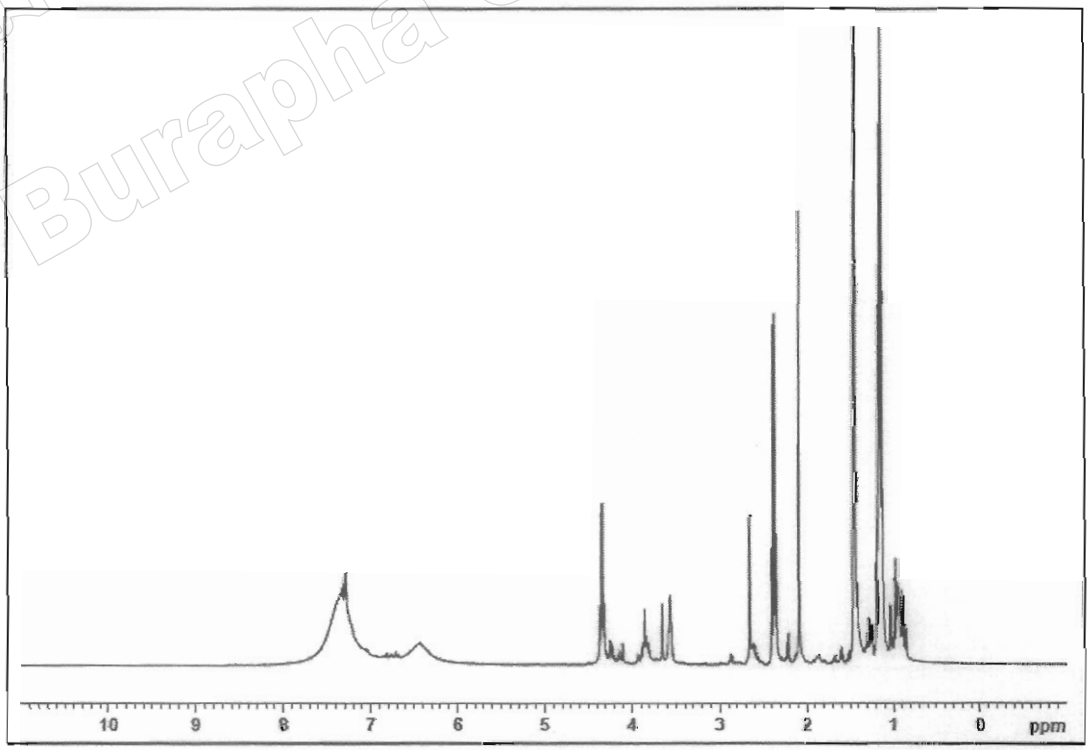
4.3 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของสารตัวอย่าง

เมื่อนำตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ และตัวอย่างปุ๋ยน้ำที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลาย ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR-spectroscopy) เพื่อยืนยันสูตรโครงสร้างเบื้องต้น โดยสเปกตรัม ^{1}H-NMR ที่ได้แสดงดังภาพที่ 4-10, 4-11, 4-12 และ 4-13 จากสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์บางส่วน เนื่องมาจากในน้ำหมักชีวภาพอาจมีสาร หรือฮอร์โมนพืชชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์เช่นเดียวกับบราสสิโนไลด์อยู่ด้วย เช่น 28-โฮโมบราสสิโนไลด์ 28-นอร์บราสสิโนไลด์ 24-อีพิบราสสิโนไลด์ และแคสตาสเตอโรน เป็นต้น แสดงดังภาพที่ 4-14, 4-15, 4-16 และ 4-17 ตามลำดับ ซึ่งเป็นสเปกตรัมของฮอร์โมนพืชทั้งสี่ชนิดดังกล่าวที่ได้จากการคำนวณโดยโปรแกรม ChemDraw จึงทำให้ค่าเคมิคัลชิพที่ปรากฏอยู่ในสเปกตรัมของสารตัวอย่างเกิดการเลื่อน (Shift) และมีความแตกต่างกับค่าเคมิคัลชิพในสเปกตรัมของสารมาตรฐานบราสสิโนไลด์ไปบางส่วน โดยในงานวิจัยนี้สามารถทำการพิสูจน์ได้เบื้องต้นว่าในตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์นี้มีฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์อยู่จริงดังกล่าวข้างต้น ซึ่งในอนาคตอาจจะต้องทำการแยกสารตัวอย่างให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นก่อน แล้วจึงนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปวิเคราะห์โครงสร้างที่แน่นอนด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR ^{13}C-NMR และ/ หรือ 2D NMR เพื่อทำให้ผลการวิเคราะห์มีความแน่นอน ถูกต้อง และน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

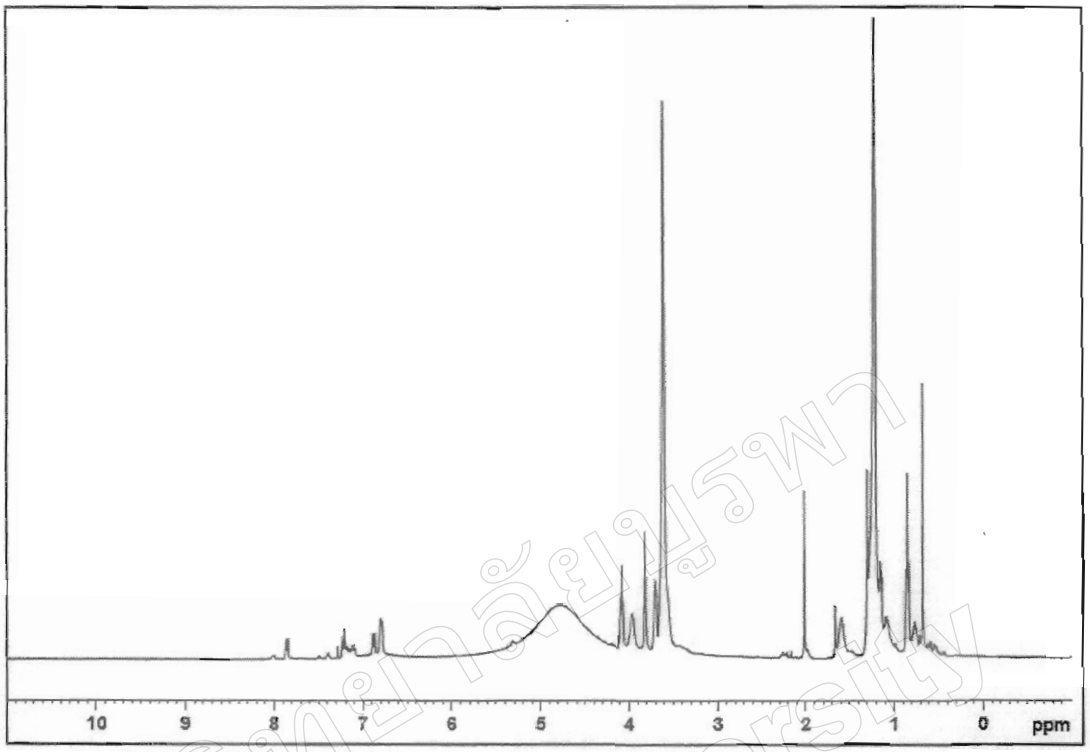


ภาพที่ 4-10 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของสารมาตรฐานบราสสิโนไลด์

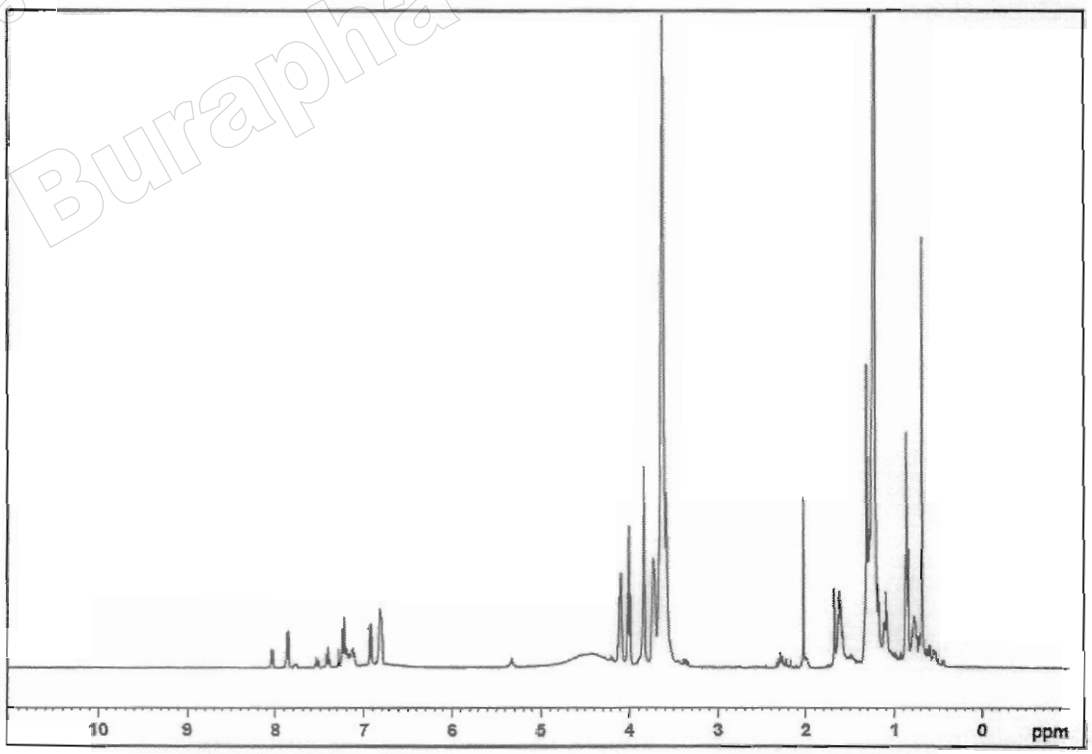


ภาพที่ 4-11 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของสารสกัดจากน้ำหมักชีวภาพข้าว

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

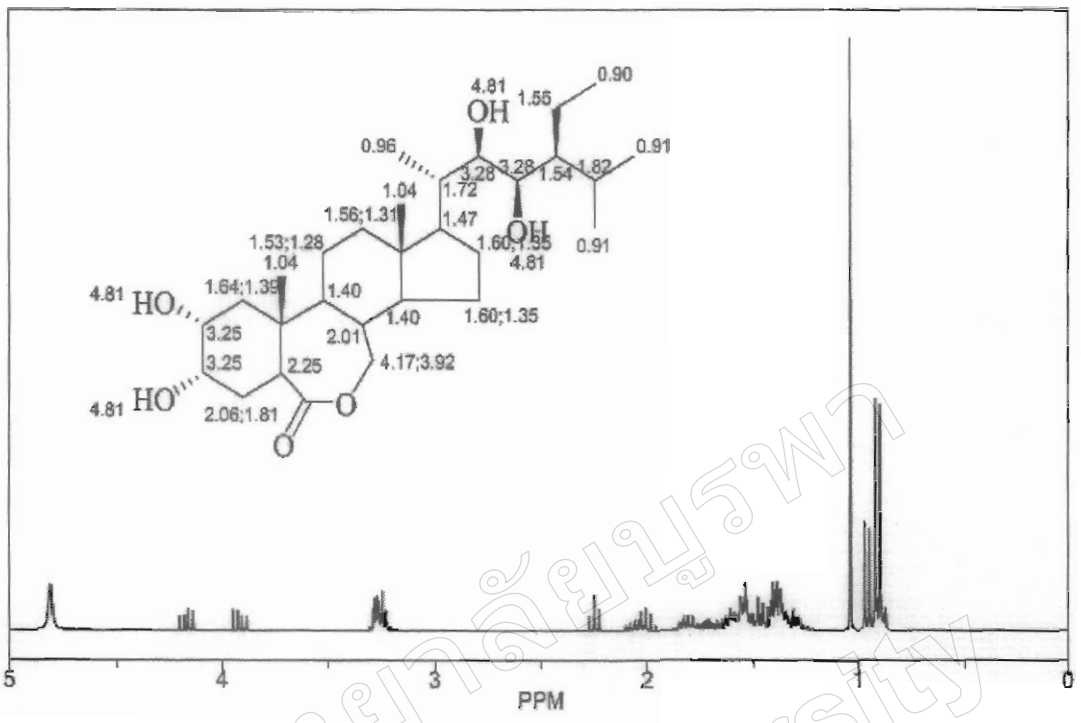


ภาพที่ 4-12 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของสารสกัดจากปุ๋ยน้ำ ค

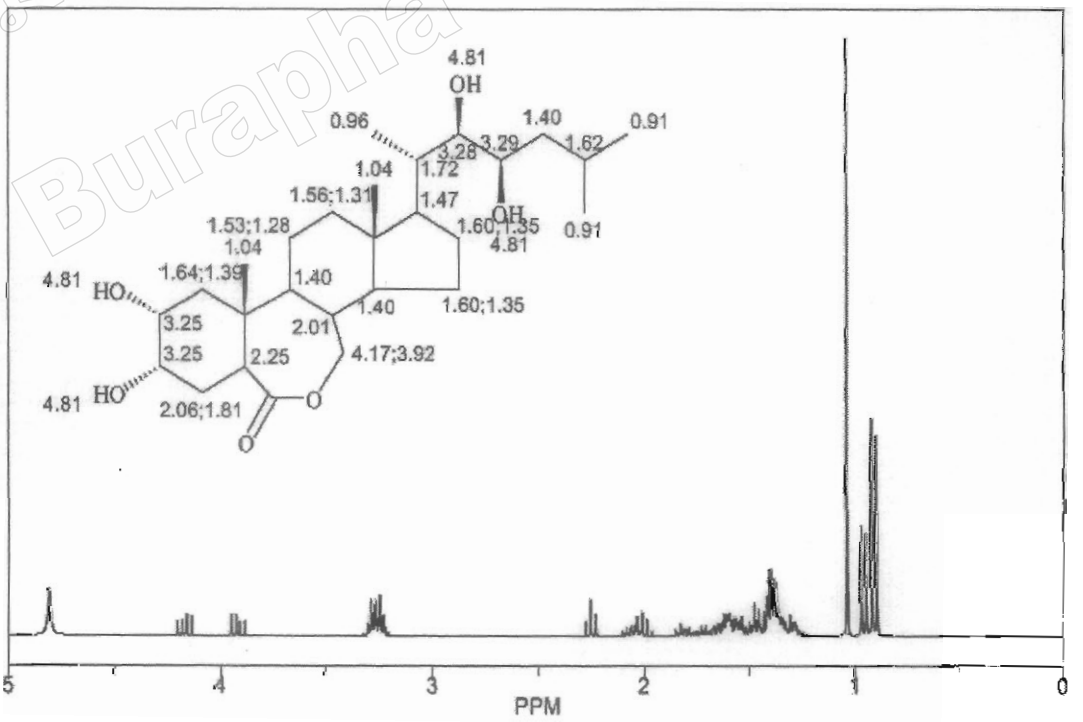


ภาพที่ 4-13 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของสารสกัดจากปุ๋ยน้ำ ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

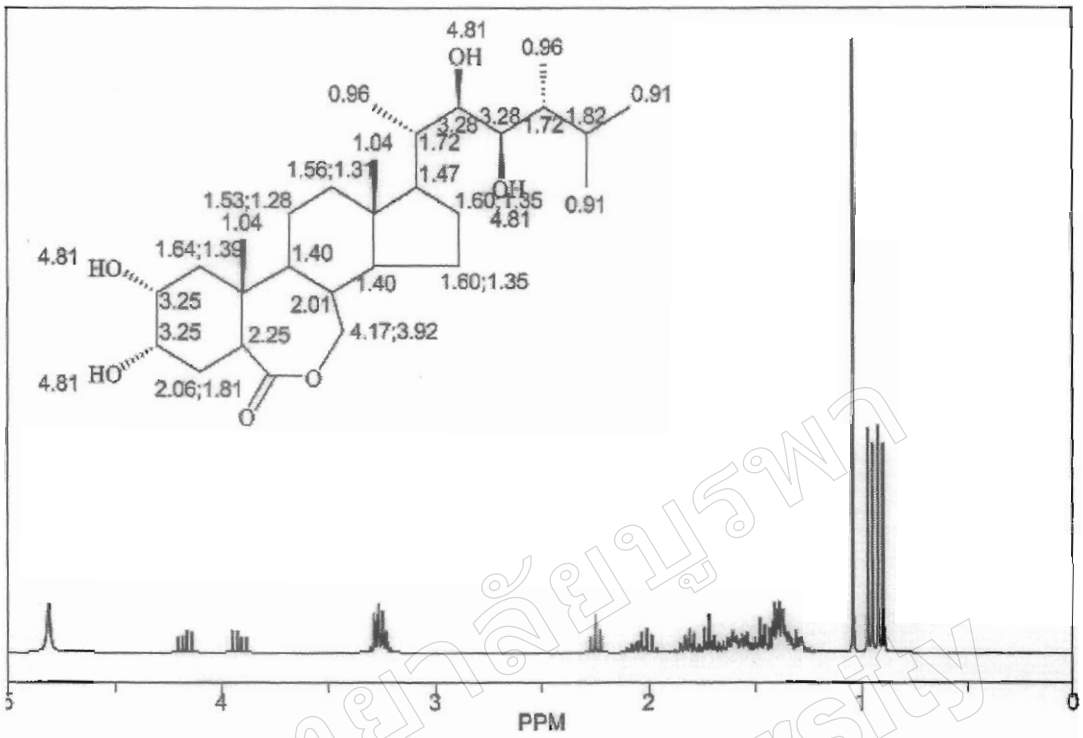


ภาพที่ 4-14 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ 28-โฮโมบราสสิโนไลด์ ที่ได้จากการคำนวณ โดยโปรแกรม ChemDraw

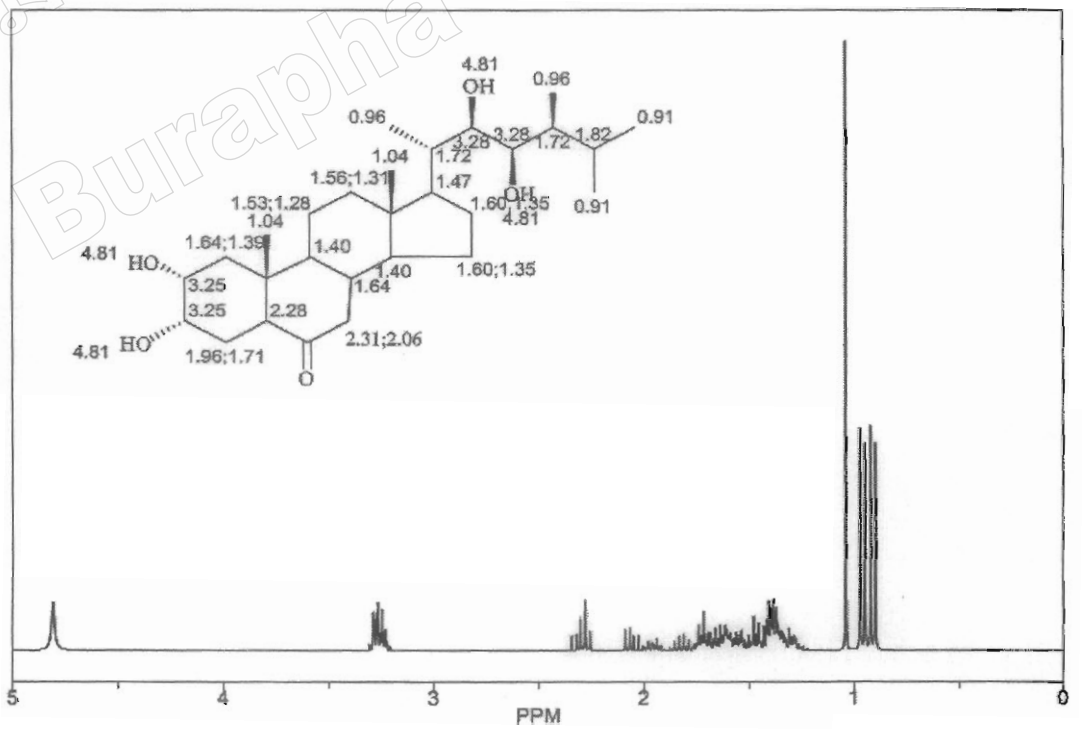


ภาพที่ 4-15 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ 28-นอร์บราสสิโนไลด์ ที่ได้จากการคำนวณ โดยโปรแกรม ChemDraw

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



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



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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.4 ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์ในตัวอย่าง

เมื่อพิจารณาจากค่าร้อยละการได้กลับคืนของตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ และปุ๋ยน้ำ พบว่าค่าที่ได้ต่ำกว่า 100 เปอร์เซ็นต์มาก และมีการกระจายตัวสูง แสดงให้เห็นว่าในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ และปุ๋ยน้ำ มีเมทริกซ์ที่รบกวนการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ทำให้ปริมาณที่วิเคราะห์ได้น้อยกว่าที่มีอยู่จริงในตัวอย่าง ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ และปุ๋ยน้ำ จึงต้องใช้วิธี Standard Addition โดยวิเคราะห์ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำหมักชีวภาพ 11 ตัวอย่าง และตัวอย่างปุ๋ยน้ำ 4 ตัวอย่าง ซึ่งการทดลองทำวิธีเดียวกับการหาค่าร้อยละการได้กลับคืน จึงได้ใช้ผลข้อมูลจากการทดลองเดียวกัน มาคำนวณหาปริมาณด้วยวิธี Standard Addition ผลแสดงดังตารางที่ 4-4 และ 4-5 จากการทดลองพบว่า ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพทั้ง 11 ตัวอย่าง มีปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์อยู่ในช่วง 2.70-32.02 ไมโครโมลาร์ หรือ 1.30-15.39 มิลลิกรัมต่อลิตร และในตัวอย่างปุ๋ยน้ำทั้ง 4 ตัวอย่าง มีค่าอยู่ในช่วง 4.65-282.7 ไมโครโมลาร์ หรือ 2.24-135.9 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4-4 ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ ในหน่วยไมโครโมลาร์ (n = 3)

ตัวอย่าง น้ำหมักชีวภาพ	บราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์) *	ตัวอย่าง น้ำหมักชีวภาพ	บราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์) *
ขมิ้น	2.70 ± 0.07	ย่านาง	13.20 ± 0.73
โหระพา	2.92 ± 0.21	ข้าว	17.82 ± 1.09
ลองกอง	4.28 ± 0.15	มะเขือเทศ	18.74 ± 0.71
มะยม	4.59 ± 0.20	ข่า	20.64 ± 1.09
ขิง	5.07 ± 0.20	แก้วมังกร	32.02 ± 3.61
เงาะ	8.32 ± 0.56		

หมายเหตุ * ปริมาณบราสสิโนไลด์ ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 1ข ในภาคผนวก ข

ตารางที่ 4-5 ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ในตัวอย่างปุ๋ยน้ำ ในหน่วยไมโครโมลาร์ (n = 3)

ตัวอย่างปุ๋ยน้ำ	บราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์) *
ก	117.4 ± 11.2
ข	4.65 ± 0.76
ค	281.0 ± 28.4
ง	282.7 ± 4.6

หมายเหตุ * ปริมาณบราสสิโนไลด์ ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 2ข ในภาคผนวก ข

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ พบว่าตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพข้าว มะเขือเทศ ข่า และแก้วมังกร มีปริมาณของฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์อยู่ในปริมาณสูงกว่าตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพจากพืชชนิดอื่น ๆ และในตัวอย่างปุ๋ยน้ำ ค และ ง สามารถตรวจพบปริมาณของฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์รวม ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์อยู่ในปริมาณสูงกว่าตัวอย่างปุ๋ยน้ำ ก และ ข สำหรับการนำมาประยุกต์ใช้ควรทำการศึกษาถึงอัตราส่วนที่เจือจางด้วยน้ำของน้ำหมักชีวภาพที่ต้องการใช้ก่อน เพื่อให้มีความเหมาะสมกับพืชนั้น ๆ เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีความต้องการฮอร์โมน หรือธาตุอาหารในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน เช่น ในต้นลำไย ควรใช้บราสสิโนสเตียรอยด์ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงจะสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตในด้านความกว้าง ความยาว และความหนาของผลลำไยได้ (ชรัสนันท์ ตาชม, 2548) เป็นต้น