บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้

Incubator shaker model KF4 บริษัท Infors. Ltd., Switzerland.

Aquartherm water bath shaker model G-86 บริษัท New Brunswick Scientific, Co., Inc., N.J., U.S.A.

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

Kubota KR-20000 T บริษัท Kubota Corporation, Tokyo 113, Japan.

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) Shimadzu UV-160 บริษัท Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan.

เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) model HA-26 บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan.

เครื่องแกสโครมาโตกราฟี (Gas chromatography) Hitachi 163 บริษัท Hitachi Ltd, Tokyo, Japan.

เครื่องเขย่า (Vortex) Vortex-Genie model K-550-GE บริษัท Scientific Industries, Inc., Bohemia, N.Y.11716, U.S.A.

เครื่องเขย่าสำหรับสกัดแยกสาร (Extracting machine) model V-ON บริษัท Iwaki Ltd., Japan.

เครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจน Buchi 315 Distillation Unit และ Buchi 425 Digestor บริษัท Buchi Laboratory-Techniques Ltd., Switzerland.

เครื่องวิเคราะห์หาจุดหลอมเหลว (Melting point apparatus) Gallenkamp MFB 600 บริษัท Gallenkamp Inc., U.S.A.

เครื่องอินฟราเรด สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Infrared spectrophoto meter) model 440 บริษัท Shimadzu, Japan.

เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปคโตรมิเตอร์ (nuclear magnetic resonance spectrometer) model FX-90 Q บริษัท Jeol, Japan.

เครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ (mass spectrometer) model M-80 บริษัท Hitachi, Japan.

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีเกรดวิเคราะห์	บริษัทผู้ผลิต
1. คอร์นสตีพลิเคอร์ (corn steep liquor)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
2. 4-แอนโดรสตีน-3, 17-ไดโอน (4-androstene-3, 17-dione)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
3. คอเลสเตียรอล (cholesterol)	Wako pure Chemicals Industries, Ltd., Japan
4. สติกมาสเตียรอล (stigmasterol)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
5. เบตา-ซิโตสเตียรอล (B-Sitosterol)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
6. เฮกเซน (hexane)	E. Merck Damstadt , Germany
7. ซิลิกา เจล (silica gel)	E. Merck Damstadt , Germany

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีอื่นๆที่ใช้นอกจากที่กล่าวนี้ สั่งซื้อจากบริษัท E. Merck Damstadt, Germany เอทธิลอะซีเตท (ethyl acetate) เอทธานอล (ethanol) และเมทธานอล (methanol) ใช้เกรดทางการค้า (commercial grade)

2. เชื้อจุลินทรีย์ การเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79

2.1 <u>เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง</u>

Mycobacterium fortuitum CBS 313.79

2.2 <u>การเก็บรักษาเชื้อ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79</u>

เขี่ยเชื้อ *Mycobacterium fortuitum*CBS 313.79 โดยใช้ลูป (loop) เขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) โลเวนสไตน์เจนเซ่น มีเดียม เบส อการ์ (Lowenstein-Jensen Medium Base Agar, ภาคผนวกที่ 1.1) บ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ.เป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วจึงนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (deepfreezer) อุณหภูมิ -70° ซ.

2.3 <u>การเตรียมหัวเชื้อรุ่นที่ 1(preinoculum)ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)</u>

เขี่ยเชื้อ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 จากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตาม ข้อ 2.2 1 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ นิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์ กลีเซอรอล และทวีน 80 (Nutrient broth yeast extract glycerol tween 80, ภาคผนวกที่ 1.2.4) ปริมาตร 50 มล.ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Infors KF4) ที่ 30° ซ. ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที โดยเลือกการเขย่าแบบวงกลม (rotary shaking) เป็นเวลา 3 วัน

2.4 <u>การเตรียมหัวเชื้อรุ่นที่ 2 (inoculum) ในขวดรูปชมพู่</u>

ถ่ายหัวเชื้อรุ่นที่ 1 ลงในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อที่มีองค์ประกอบดังกล่าวในข้อ

2.3 โดยใช้ 0.5 มล. ซึ่งวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรได้ 4.0 มล.ต่ออาหารเลี้ยงหัวเชื้อรุ่นที่ 2 50 มล. ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Infors KF4) ที่ 30° ซ. ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที โดยเลือกการเขย่าแบบวงกลม (rotary shaking)

2.5 การเลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79เพื่อผลิต 4-แอนโดรสตีน 3, 17-ไดโอน (4-androstene-3, 17-dione, AD) ในขวดก้นบุบ

ถ่าย 5 มล. ของหัวเชื้อรุ่นที่ 2 ซึ่งมีการเจริญของเชื้ออยู่ในช่วง log phase ที่เวลา 76 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลวที่จะใช้ในการผลิต AD 50 มล. (ภาคผนวกที่ 1.3, 1.4, 1.5 และ 1.6 ซึ่งบรรจุในขวดก้นบุบขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Infors KF4) ที่ 30° ซ. ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยเลือกการเขย่าแบบเส้นตรง (reciprocal shaking)

3. วิธีการวิเคราะห์

3.1 การวัดความเจริญของจุลินทรีย์โดยวิเคราะห์หาปริมาณ ดี เอน เอ (DNA) โดยปฏิกิริยาของไดฟีนิลลามีน (diphenylamine reaction) ตามวิธีการของ Clark และSwitzer (1977)

นำตัวอย่างมาเซนติฟิวส์ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกเซลจากส่วนน้ำใส เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำเซลมาบดกับผงอะลูมินาขนาด 100 - 125 เมช ในโกร่งนาน 10 นาที โดยใช้อัตราส่วนปริมาณเซลต่อผงอะลูมินา เท่ากับ 1 ต่อ 1 เติมซาไลน์ซิเตรท (saline citrate) นำส่วนผสมไปเซนติฟิวส์ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดกากเซล และผงอะลูมินา ดูดส่วนน้ำใสปริมาตร 1 มล. มาเติมสารละลายไดฟีนิลลามีน 2 มล.และสารละลายอะเซท ทอลดีไฮด์ (accetaldehyde) 0.1 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร นำค่า ดูดกลืนแสงนี้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณดีเอนเอ โดยใช้Calf thymus ดี เอน เอ ที่ความเข้น 0.04 - 0.20 มก. ต่อ มล. เป็น ดี เอน เอ มาตรฐานโดยใช้

ชาไลน์ชิเตรทเป็นตัวเทียบ (blank)

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid) ของสารละลายแป้งย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล (liquified starch)

อบอลูมิเนียมฟอยด์ (aluminium foil) ที่พับเป็นรูปถ้วยเล็ก ๆ ที่อุณหภูมิ 105° ซ. นาน 3 ชม. ปล่อยให้เย็นในเดซซิเคเตอร์ (desiccator) นำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียดศอทศนิยม 4 ตำแหน่ง ปิเปตสารละลายแป้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิลที่เตรียมได้มา 1 มล.ใส่ลงในภาชนะดังกล่าวข้างต้น นำไปอบที่อุณหภูมิ 105° ซ. จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณของแข็งทั้งหมด

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) โดยวิธีของ Bernfeld (1955)

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิค 1 มล. ลงในตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ ปริมาตร 1 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำปริมาตร 10 มล. เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จากกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 0.1-1.0 มก. ต่อ มล. เป็นน้ำตาลรีดิวส์มาตรฐาน ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ

3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสโดยวิธีของ Huggett และ Nixon

เติมสารละลาย พี จี โอ เอนไซม์ (P.G.O. Enzyme, ภาคผนวกที่ 2.3) ปริมาตร 2.5 มล. ลงในสารละลายตัวอย่าง 0.25 มล. โดยใช้น้ำกลั่น 0.25 มล. เป็นตัวเทียบ เขย่าให้เข้ากันแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37° ซ. นาน 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงของสารที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร และหาค่าปริมาณกลูโคสของสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0 - 200 ไมโครกรัมต่อ มล.

3.5 <u>การวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร</u>

โดยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter ; Radiometer model PHM 82)

3.6 <u>การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) โดยวิธี Kjeldahl</u>

ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ลงในขวดกลั่นขนาด 300 มล. เติมของผสมของเกลือ (ภาคผนวกที่ 2.4.1) 7 กรัม และเติมกรดกำมะถันเข้มข้นปริมาตร 15 มล. นำไปย่อยบนเตาหลุม (digestor) ด้วยเครื่อง Buchi 425 จนได้สารละลายใสในตู้ควันทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล. และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 37% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 20 มล. รองรับสารที่กลั่นออกมาด้วยสารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้น 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มล. ซึ่งมีอินดิเคเตอร์ผสม (mixed indicator) (ภาคผนวกที่ 2.4.2) อยู่ 3 หยด กลั่นตัวอย่างจนกระทั่งสารละลายกรดบอริกมีปริมาตร เป็น 250 มล. นำสารละลายที่ได้มาติเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดกำมะถัน (ภาคผนวกที่ 2.4.3) จนได้สารละลายสีเทาออกชมพู โดยที่

$$\text{ร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมด} = \frac{(A-B)(N)(1.4)}{W}$$

A = ปริมาตร (มล.) ของกรดกำมะถันที่ใช้ติเตรทกับตัวอย่าง

B = ปริมาตร (มล.) ของกรดกำมะถันที่ใช้ติเตรทกับแบลงค์

N = ความเข้มข้น (นอร์มอล) ของกรดกำมะถัน

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

3.7 <u>การวิเคราะห์ AD โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin layer chromatography, TLC)</u>

ละลายสารตัวอย่างด้วยเอทธิลอะซีเตท จุด(spot) สารละลายตัวอย่าง 5-10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นซิลิกา (TLC aluminium sheet Silica gel 60

F_{254} precoated, 20 ซม. x 20 ซม. หนา 0.2 มม.) ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องหรือเป่าด้วยลมเย็น นำแผ่น TLC ไปวางในแนวตั้งในถังตัวทำละลาย (solvent tank) ที่ปิดสนิท ให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ขึ้นตามแผ่นซิลิกาผ่านจุดสารตัวอย่างในแนวตั้งฉากจากล่างขึ้นบน (ascending) จนแนวของตัวทำละลาย (solvent front) เคลื่อนขึ้นจนเกือบถึงด้านบนสุดของแผ่นซิลิกา นำแผ่นซิลิกาดังกล่าวออกจากถังตัวทำละลาย นำไปดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (ultraviolet) หรือพ่นด้วยสารละลาย 5% ของกรดกำมะถันเข้มข้น (sulfuric acid) ใน เอทธานอล (ethanol) นำแผ่นซิลิกาไปอบในตู้อุณหภูมิ 110 ซ. เป็นเวลา 5 - 10 นาที หาค่า R_f ของสารตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบค่า R_f ของสาร AD มาตรฐาน

โดยที่ R_f = $\frac{\text{ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ในระบบตัวทำละลายที่กำหนด}}$

ระบบตัวทำละลาย (solvent system) ที่ใช้ได้แก่

1. ไซโคลเฮกเซนต่อเอทธิลอะซีเตท ในอัตราส่วน 3 ต่อ 2 (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Wovcha และ Brooks, 1979)
2. คลอโรฟอร์มต่อเมทธานอล ในอัตราส่วน 19 ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Wovcha และคณะ; 1978)

3.8 <u>การวิเคราะห์ปริมาณ AD สติกมาสเตียรอล (stigmasterol) และเบตา-ซิโตสเตียรอล (β-sitosterol) โดยวิธีแกสโครมาโตกราฟี (gas chromatography, GC)</u>

นำน้ำหมักปริมาตร 1 มล. เติมสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบ (internal standard) คอเลสเตียรอล (cholesterol) เข้มข้น 2 มก. ต่อ มล. ปริมาตร 0.1 มล. สกัดด้วยเอทธิลอะซีเตท ปริมาตร 2 มล. นำมาเขย่าอย่างแรงบนเครื่องเขย่า (Vortex mixer) เป็นเวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นจากนั้นใช้พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur pipette) ดูดสารละลายชั้นเอทธิลอะซีเตท แล้วเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (sodium sulfate anhydrous) เพื่อกำจัดน้ำ สาร

ละลายที่ได้นี้นำไปวิเคราะห์ปริมาณ AD โดยวิธีแกสโครมาโตกราฟี โดยฉีดสารละลาย 3 ไมโครลิตรเข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟี (Hitachi 163) โดยมีสภาวะดังนี้

ชนิดคอลัมน์แก้ว (glass column type)	:	OV-17 ขนาด 3 มม. x 1 ม.
ตัวดูดซับ (absorbent)	:	ยูนิพอร์ท (Uniport)HP ขนาด 60/80 เมช เคลือบด้วยซิลิโคน (ซิลิโคน OV-17)
อุณหภูมิคอลัมน์ (column temperature)	:	240° ซ.
อุณหภูมิตำแหน่งที่ฉีดสารตัวอย่าง (injection temperature)	:	260° ซ.
แกสตัวพา (carrier gas)	:	แกสไนโตรเจนด้วยความดัน 5 กก. ต่อ ซม^2
เครื่องตรวจวัด (detector)	:	เฟลมไอออไนเซชัน

โดยวิธีนี้เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของ AD 2.015 นาที สติกมาสเตียรอล 6.010 นาที เบตา-ซิโตสเตียรอล 6.615 นาที และคอเลสเตียรอลซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบ 4.006 นาที

ทำกราฟมาตรฐานของสารดังต่อไปนี้ซึ่งผ่านการสกัดและไม่ผ่านการสกัดโดยใช้ AD เข้มข้น 0.1-0.9 มก.ต่อมล. ตามลำดับ ในสารละลายเอทธิลอะซีเตทซึ่งมีสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบ 0.2 มก.ต่อมล. และฉีดเข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟีปริมาตร 3 ไมโครลิตรโดยใช้สภาวะดังกล่าวข้างต้น เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารกับอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของ AD กับคอเลสเตียรอล สติกมาสเตียรอลกับคอเลสเตียรอล และเบตา-ซิโตสเตียรอล

สำหรับกราฟมาตรฐานของ AD สติกมาสเตียรอล และ เบตา-ซิโตสเตียรอล ซึ่งผ่านการสกัดนั้นทำโดยเติมสารดังกล่าวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต AD แล้วนำไปผ่านกระบวนการสกัดก่อนการวิเคราะห์ด้วยวิธีแกสโครมาโตกราฟี

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลึก

3.9 โดยวิเคราะห์หาจุดหลอมเหลว

นำผลึกสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์มาบดให้ละเอียดแล้วบรรจุลงในหลอดแก้วสำหรับตรวจหาจุดหลอมเหลว (capillary tube)ให้ได้ความสูงพอประมาณ นำไปหาจุดหลอมเหลวโดยใช้วิธีแคปปิลารี่ (capillary method) ด้วยเครื่องวิเคราะห์หาจุดหลอมเหลวเทียบกับ AD มาตรฐาน

3.10 โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี

นำผลึกสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์มาละลายด้วยเอทธิลอะซีเตทให้ได้ความเข้มข้น 1 มก.ต่อมล. แล้วนำมาตรวจหาความบริสุทธิ์โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี ดังข้อ 3.7

3.11 โดยวิธีแกสโครมาโตกราฟี

เตรียมผลึกสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ให้ได้ความเข้มข้น 0.2 มก.ต่อมล. ในสารละลายเอทธิลอะซีเตทซึ่งมีสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบ คือ คอเลสเตียรอล 0.2 มก. ต่อมล. ตรวจหาความบริสุทธิ์ของผลึกโดยเครื่องแกสโครมาโตกราฟีตามวิธีในข้อ 3.8 คำนวณเปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์ของ AD ได้ตามสูตร

$$\% \text{ ความบริสุทธิ์ของ AD} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของ AD}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของคอเลสเตียรอล}} \times 0.2070 \times \frac{1}{0.2} \times 100$$

$0.2070 = \frac{1}{\text{slope}}$ ของกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ AD ที่ไม่ผ่านการสกัด ในขั้นตอนการสกัดแยกและทำ AD ให้บริสุทธิ์

การหาโครงสร้างทางเคมี

3.12 โดยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

นำผลึกสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ไปวัดการดูดกลืนแสงอินฟราเรดโดยใช้เทคนิคการทำแผ่น KBr ตรวจหาหมู่ฟังก์ชั่นของ AD โดยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

รุ่น IR-440 กราด (scan) ตั้งแต่เลขคลื่น 5000-300 ซม$^{-1}$ โดยเทียบกับ AD มาตรฐาน

3.13 โดยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์

นำผลึกสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์มาละลายในคลอโรฟอร์มที่อะตอมของไฮโดรเจนถูกแทนที่ด้วยดิวทีเรียม (deutero - chloroform $CDCl_3$)ความเข้มข้น 100 มก.ต่อมล. นำมาตรวจวัดจำนวนไฮโดรเจนและชนิดของไฮโดรเจน โดยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ Bruker สารอ้างอิงภายใน (internal reference) คือ เตตราเมทธิลไซเลน (tetramethylsilane, TMS)

3.14 โดยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์

นำผลึกสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์มาทำการตรวจหามวลโมเลกุลและการจัดเรียงตัวของอะตอมต่าง ๆ ในโมเลกุลโดยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ รุ่น M-80 ด้วยวิธี direct ionization อุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้สารกลายเป็นไอ คือ 250 องศาเซลเซียส

การตรวจหาโครงสร้างทางเคมีโดยอุปกรณ์ต่าง ๆ ตามวิธีในข้อ 3.12 และ3.14 ทำโดยผ่านการบริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และการตรวจหาโครงสร้างทางเคมีโดยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ ได้รับความอนุเคราะห์จาก

Dr. Takuya Nihira, Department of Fermentation Technology
Faculty of Engineering, Osaka University, Japan

---

4. วิธีการสกัดแยก AD ด้วยตัวทำละลาย

น้ำหมักที่ใช้ในการสกัดได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต AD การสกัดใช้อัตราส่วนน้ำหมัก 1 ส่วนต่อตัวทำละลาย

2 ส่วน ในการทดลองนี้ใช้น้ำหมัก 25 มล. โดยสกัดในกรวยแยกชั้น (Separating funnel) ขนาด 250 มล. เขย่าด้วยเครื่องสกัดแยกสาร (extracting machine) เป็นเวลา 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้จนส่วนผสมแยกชั้น จากนั้นนำชั้นของตัวทำละลายมากำจัดน้ำออกด้วยการเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส นำสารละลายชั้นตัวทำละลายมาวิเคราะห์หาปริมาณ AD โดยวิธีแกสโครมาโตกราฟี ตามข้อ 3.8

5. <u>การทำ AD ให้บริสุทธิ์</u>

5.1 <u>การเลือกระบบตัวทำละลาย (solvent system) ที่เหมาะสมสำหรับการแยก AD</u>

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ตามวิธีในข้อ 2.3 และ2.4 ในสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 2.5 นำน้ำหมักมาสกัดแยก AD และตรวจสอบความสามารถของระบบตัวทำละลายต่างๆในการสกัดแยก AD ออกจากน้ำหมักโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี ในข้อ 3.7

5.2 <u>การตกผลึก (Crystallization)</u>

นำสารที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตรกราฟีมาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยการตกผลึก ซึ่งทำโดยนำสารที่เตรียมได้มาเติมเอทธิลอะซีเตทปริมาตรน้อยที่สุดที่จะทำให้สารนี้ละลายได้หมดขณะร้อน นำไปอุ่นในน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส ค่อยๆเติมเฮกเซนทีละหยดจนกระทั่งสารละลายเริ่มขุ่น หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 วันเมื่อได้ผลึกแล้วทำการตกผลึกซ้ำ (recrystallization) อีก 1-2 ครั้ง โดยทำตามวิธีเดิมจนได้ผลึกรูปเข็มสีขาว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย