บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ตู้เลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator) รุ่น D 3165 ของบริษัท Hanigsen, West Germany

ตู้เลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (controlled environment incubator shaker) ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., U.S.A.

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HL 98 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Co., Japan

เครื่องเขย่าสำหรับสกัดแยกสาร (extracting machine) รุ่น V-ON ของบริษัท Iwaki, Japan

เครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan

เครื่อง fraction collector รุ่น 7000 Ultrarac ของบริษัท LKB Bromma, Sweden

เครื่องแกสโครมาโตกราฟ (gas chromatograph) รุ่น 163 ของบริษัท Hitachi, Japan

เครื่องไฮเพอร์ฟอแม็นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟ (high performance liquid chromatograph) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan

เครื่องอินฟราเรดสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (infrared spectrophotometer) รุ่น 440 ของบริษัท Shimadzu, Japan

เครื่องอุลตราไวโอเลท-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (ultraviolet-visible spectrophotometer) รุ่น 240 A ของบริษัท Shimadzu, Japan

เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปคโตรมิเตอร์ (nuclear magnetic resonance spectrometer) รุ่น FX-90Q ของบริษัท Jeol, Japan

เครื่องวิเคราะห์ธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ออกซิเจน (elemental analyzer CHNO) รุ่น 240 C ของบริษัท Perkin-Elmer, U.S.A.

เครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ (mass spectrometer) รุ่น M-80 ของบริษัท Hitachi, Japan

เครื่องตรวจหาจุดหลอมเหลว (melting point apparatus) ของบริษัท Electrothermal, England

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

แป้งมันสำปะหลังชนิดที่มีคุณภาพสูง (super grade) ของบริษัท ไทยวาจำกัด ประเทศไทย

กรดไตรฟลูออโรอะซิติก แอนไฮไดรด์ (trifluoroacetic anhydride) ของบริษัท E. Merck Darnstadt, Germany

เฮกซะฟลูออโรไอโซโพรพานอล (hexafluoroisopropanol) ของบริษัท E. Merck Darnstadt, Germany

กรดลิโทโคลิก (lithocholic acid) กรดคีโนดีออกซีโคลิก (Chenodeoxycholic acid) กรดดีออกซีโคลิก (deoxycholic acid) กรดอูโซดีออกซีโคลิก (ursodeoxycholic acid) ของบริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A.

ซิลิกาเจล (silica gel) ของบริษัท Wako Pure Chemical Industry, Japan

แผ่นโครมาโตกราฟแบบผิวบางที่เคลือบด้วยซิลิกา (thin layer chromatograph coated with silica) ของบริษัท E. Merck Darnstadt, Germany

สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้เป็นเคมีภัณฑ์ระดับวิเคราะห์ (analytical grade) จากบริษัทต่าง ๆ นำมาใช้โดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีก

2.3 การเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ Absidia sp. BA 16

2.3.1 การเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง

เขี่ยสปอร์ของเชื้อรา 1 ลูป (loop) มาลาก (streak) บนอาหารโปเตโตเด็กซโตรสเอการ์ชนิดเอียง (slant) (ภาคผนวก 1.1) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน

2.3.2 การเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวในระดับขวดเขย่า (shake flask)

เตรียมสปอร์แขวนลอยในน้ำ (spore suspension) โดยเหน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดเก็บเชื้อ (stock culture) ซึ่งมีสปอร์อายุ 5 วัน และใช้ลูปเขี่ยให้สปอร์หลุดออกมาอยู่ในน้ำ หลังจากนั้นนำสปอร์แขวนลอยนี้ 5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับเตรียมหัวเชื้อ (starter) (ภาคผนวก 1.2) 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำหัวเชื้อที่เตรียมได้นี้ 5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิต (ภาคผนวก 1.3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มในตู้เลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่าที่ 45 องศาเซลเซียสความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

2.4 วิธีการสกัดแยกกรดน้ำดีออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งเชื้อรา (culture broth) เพื่อใช้ในการตรวจหาโดยวิธีโครมาโตกราฟแบบผิวบาง

นำเชื้อรารวมทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตซึ่งเพาะเลี้ยงตามวิธีข้อ 2.3 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรดด่างด้วยกรดเกลือความเข้มข้น 3 โมลาร์ ให้ได้ค่าพีเอชประมาณ 3 สกัดแยกด้วยเอทธิลอซีเตท ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วนอาหารเหลวรวมทั้งเชื้อราต่อเอทธิลอซีเตท เท่ากับ 1 ต่อ 5) ด้วยเครื่องเขย่าสำหรับสกัดแยกสาร (extracting machine) จากนั้นนำชั้นของเอทธิลอซีเตทมากำจัดน้ำออกด้วยการเติมโซเดียมซัลเฟทแอนไฮดรัส (sodium sulphate anhydrous) แบ่งเอทธิลอซีเตท 50 มิลลิลิตร มาระเหยเอาเอทธิลอซีเตทออกจนแห้ง โดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส นำมาละลายด้วยเอทธานอล (ethanol) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2.5 การตรวจหากรดน้ำดีโดยวิธีโครมาโตกราฟแบบผิวบาง

2.5.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดน้ำดี

กรดน้ำดีมาตรฐานที่ใช้คือ กรดลิโทโคลิก กรดอูโซดีออกซีโคลิก กรดคีโนดีออกซีโคลิก กรด 3 แอลฟา 15 เบตาไดไฮดรอกซี 5 เบตาโคลานิก (3α, 15β-dihydroxy-5β-Cholanic acid, 3α, 15β DHC) ละลายกรดน้ำดีมาตรฐานด้วยเอทธานอลให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร

2.5.2 วิธีโครมาโตกราฟแบบผิวบาง

กระตุ้นแผ่นแก้วที่เคลือบด้วยซิลิกาเจนิดที่ไม่มีสารฟลูออเรสเซนท์ (TLC plate) ความหนา 0.25 มิลลิเมตร ขนาด 20x20 เซนติเมตร โดยอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที ลากเส้นที่บริเวณห่างจากขอบด้านล่างและด้านบนด้านละ 2.5 เซนติเมตร หยด (spot) สารละลายมาตรฐานของกรดน้ำดีซึ่งเตรียมไว้ตามข้อ 2.5.1 และสารละลายของกรดน้ำดีที่สกัดไว้

ตามข้อ 2.4 โดยให้แต่ละจุดห่างกัน 1 เซนติเมตร ทำการแยกด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง เมื่อตัวทำละลายในระบบเคลื่อนที่ถึงเส้นด้านบน นำออกมาทำให้แห้ง พ่นแผ่นโครมาโตแกรมด้วยกรดซัลฟูริคที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์(29) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของจุดต่าง ๆ ที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นโครมาโตแกรมและสังเกตสีที่ปรากฏด้วย

2.6 <u>วิธีการสกัดแยกกรดน้ำดีออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งเชื้อราเพื่อใช้ในการตรวจหาโดยวิธีแกสโครมาโตกราฟี</u>

นำเชื้อราร่วมทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตหลังจากการเพาะเลี้ยงตามวิธีข้อ 2.3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม 1 มิลลิลิตรของกรดดีออกซีโคลิกความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับความเป็นกรดด่างด้วยกรดเกลือความเข้มข้น 3 โมลาร์ ให้ได้พีเอชประมาณ 3 สกัดแยกด้วยเอทธิลอซีเตทปริมาตร 50 มิลลิลิตร (อัตราส่วนอาหารเหลวรวมทั้งเชื้อราต่อเอทธิลอซีเตทเท่ากับ 1 ต่อ 5) ด้วยเครื่องเขย่าสำหรับสกัดแยกสาร แยกชั้นเอทธิลอซีเตทออกจากชั้นน้ำและกำจัดน้ำออกด้วยการเติมโซเดียมซัลเฟทแอนไฮดรัส แบ่งเอทธิลอซีเตทมา 20มิลลิลิตรระเหยเอาเอทธิลอซีเตทออกจนแห้งโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศแบบหมุน

2.7 <u>การตรวจหากรดน้ำดีโดยวิธีแกสโครมาโตกราฟี</u>

2.7.1 <u>เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์</u>

ใช้เครื่องแกสโครมาโตกราฟ (41) ซึ่งประกอบด้วยคอลัมน์แก้วขนาด 3 มิลลิเมตร x 1 เมตร โดยมี 2 เปอร์เซนต์ silicone DC-QF-1 บน uniport HP 80/100 mesh เป็นตัวดูดซับ (adsorbent) แกสไนโตรเจนเป็นตัวพา (carrier gas) อุณหภูมิของการฉีดตัวอย่าง (injection temperature) เท่ากับ 240 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของคอลัมน์และอัตราการไหลของแกสตัวพาที่เหมาะสม ปริมาตรสารที่ใช้ในการฉีดคือ 1 ไมโครลิตร ติดตามกรดน้ำดีที่ผ่านคอลัมน์ด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดเฟลม

ไอออไนเซชัน (flame ionization detector) โดยใช้ความดันของไฮโดรเจนต่ออากาศในการจุดเปลวไฟคือ 1 ต่อ 1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

2.7.2 การเตรียมอนุพันธ์เอสเตอร์ของกรดน้ำดี (36)

นำกรดน้ำดีปริมาณไม่เกิน 6,000 ไมโครกรัมมาเติมกรดไตรฟลูออโรอเซติกแอนไฮไดรด์ (trifluoroacetic acid anhydride, TFA) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ เฮกสะฟลูออโรไอโสโพรพานอล (hexafluoroisopropanol, HFIP) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ระเหยเอาตัวทำละลายออกจนแห้ง แล้วเติมอซีโตไนไตรล์ (acetonitrile) 0.5 - 1.0 มิลลิลิตร

2.7.3 ศึกษาอุณหภูมิของคอลัมน์และอัตราการไหลของแกสไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของกรดน้ำดี

เพาะเลี้ยงเชื้อรา Absidia sp. BA 16 ตามวิธีในข้อ 2.3 ที่อุณหภูมิและช่วงเวลาที่เหมาะสมซึ่งเป็นผลจากการศึกษาในข้อ 2.9 สกัดกรดน้ำดีและเตรียมอนุพันธ์เอสเตอร์ของกรดน้ำดีตามที่กล่าวในข้อ 2.6 และ 2.7.2 นำมาตรวจวัดปริมาณโดยเครื่องแกสโครมาโตกราฟดังกล่าวในข้อ 2.7.1 แปรเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 210 220 และ 230 องศาเซลเซียสและแปรเปลี่ยนความดันของแกสไนโตรเจนตั้งแต่ 0.8 ถึง 1.2 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตรที่อุณหภูมิหนึ่ง ๆ อุณหภูมิของคอลัมน์และความดันของแกสไนโตรเจนที่เหมาะสมคืออุณหภูมิและความดันของแกสไนโตรเจนที่ทำให้พีคต่าง ๆ แยกออกจากกันได้ดี รูปร่างของพีคมีลักษณะสมมาตร เวลาที่พีคปรากฏบนกระดาษบันทึกนับตั้งแต่ฉีดตัวอย่าง มีระยะเวลาพอสมควรและมีค่าเอชอีทีพี (HETP = height equivalent theoritical plate) ต่ำ คำนวณหาค่าเอชอีทีพีและค่าความสามารถในการแยกของพีค

2.7.4 การหาปริมาณของกรดน้ำดี

นำกรดน้ำดีซึ่งสกัดแยกตามวิธีในข้อ 2.6 มาเตรียมอนุพันธ์เอสเตอร์ตามวิธีในข้อ 2.7.2 ตรวจวัดด้วยเครื่องแกสโครมาโตกราฟตามวิธีในข้อ 2.7.1 และใช้อุณหภูมิของคอลัมน์ และความดันของแกสไนโตรเจนที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองตามวิธีข้อ 2.7.3 คำนวณปริมาณกรดน้ำดีโดยใช้พื้นที่ใต้พีคเทียบกับสารมาตรฐานกรดคีโนดีออกซีโคลิก

2.8 การตรวจหาและเลือกอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่เปลี่ยนรูปจากกรดลิโทโคลิกโดยเชื้อราสายพันธุ์ Absidia sp. BA 16

เพาะเลี้ยงเชื้อรา Absidia sp. BA 16 ตามวิธีในข้อ 2.3 ตรวจหาผลิตภัณฑ์ที่ผลิตเมื่อเชื้อรามีอายุ 6 24 48 72 120 ชั่วโมงตามลำดับ สกัดและตรวจหาผลิตภัณฑ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบางดังกล่าวในข้อ 2.4 และ 2.5 ผลิตภัณฑ์ที่สนใจคือผลิตภัณฑ์ที่ให้ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์และสีใกล้เคียงกับกรดน้ำดีมาตรฐานทั้งสองชนิด คือ กรดคีโนดีออกซีโคลิกและกรดอูโซดีออกซีโคลิก

2.9 ศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกโดยเชื้อรา Absidia sp. BA 16 ในระดับขวดเขย่า (shake flask)

เพาะเลี้ยงเชื้อรา Absidia sp. BA 16 ตามวิธีในข้อ 2.3 แต่บ่มเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส สกัดและตรวจหาอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบางตามวิธีข้อ 2.4 และ 2.5 เมื่ออายุของเชื้อราที่เพาะเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตเท่ากับ 72 และ 120 ชั่วโมง เปรียบเทียบความเข้มของสีที่ปรากฏบนโครมาโตกราฟแบบผิวบาง เลือกเวลาที่เชื้อราผลิตอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่สนใจในปริมาณมาก

2.10 การทำให้อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกบริสุทธิ์

2.10.1 การเลือกระบบตัวทำละลาย (solvent system) ที่เหมาะ

สมสำหรับการแยกอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก

เพาะเลี้ยงเชื้อรา Absidia sp. BA 16 ตามวิธีในข้อ 2.3 ในสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 2.9 สกัดแยกกรดน้ำดีและตรวจสอบความสามารถในการแยกของระบบตัวทำละลายต่าง ๆ โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบางตามวิธีในข้อ 2.4 และ 2.5 ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม คือ ระบบตัวทำละลายที่สามารถแยกอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกออกจากสิ่งเจือปนได้ในเวลาที่เหมาะสม

ระบบตัวทำละลายที่ใช้ศึกษา คือ (23,24)

ชื่อ	องค์ประกอบของระบบตัวทำละลาย	อัตราส่วนโดยปริมาตร
Ia	ไตรเมทธิลเพนเทน:ไอโสโพรพานอล:กรดน้ำส้ม	30:10:1.0
Ib	ไตรเมทธิลเพนเทน:ไอโสโพรพานอล:กรดน้ำส้ม	60:20:0.5
Ic	ไตรเมทธิลเพนเทน:เอทธิลอซีเตท:กรดน้ำส้ม	10:10:2.0
Id	ไตรเมทธิลเพนเทน:เอทธิลอซีเตท:กรดน้ำส้ม	5:25:0.2
Ie	ไตรเมทธิลเพนเทน:เอทธิลอซีเตท:กรดน้ำส้ม	50:50:0.7
If	ไตรเมทธิลเพนเทน:เอทธิลอซีเตท:กรดน้ำส้ม	10:10:0.25
Ig	ไตรเมทธิลเพนเทน:เอทธิลอซีเตท:กรดน้ำส้ม	10:10:0.1
Ih	ไดเอทธิลออกซาเลท:ไดออกเซน	40:10
Ij	เบนซีน:ไดออกเซน:กรดน้ำส้ม	75:20:2.0
A	เบนซีน:อซีโตน:กรดน้ำส้ม	50:10:0.6
B	คลอโรฟอร์ม:อซีโตน:กรดน้ำส้ม	100:100:1.0
C	คลอโรฟอร์ม:อซีโตน:กรดน้ำส้ม	50:10:0.6
D	ไดเอทธิลอีเธอร์:กรดน้ำส้ม	50:0.1
E	คลอโรฟอร์ม:เมทธานอล:กรดน้ำส้ม:น้ำ	130:50:4:8

2.10.2 การทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

2.10.2.1 การเตรียมคอลัมน์ของซิลิกาเจล

กระตุ้นซิลิกาเจลที่ใช้เป็นตัวดูดซับ (C-300 for column chromatography) โดยอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที น้ำหนักของซิลิกาเจลเป็น 20 เท่าของน้ำหนักสารที่ต้องการแยก นำซิลิกามาแช่ในตัวทำละลายที่เหมาะสมซึ่งเลือกได้จากการศึกษาในข้อ 2.10.1 กวนให้เข้ากันและให้มีความหนืดพอควร บรรจุเจลนี้ลงในคอลัมน์แก้ว ขนาด 2.5x70 เซนติเมตร รอจนกระทั่งการจัดเรียงตัวของซิลิกาเจลในคอลัมน์เหมาะสม โดยดูจากขอบบนของซิลิกาเจล ซึ่งจะคงที่เมื่อผ่านระบบตัวทำละลายที่ใช้อย่างต่อเนื่องและเป็นระบบตัวทำละลายเดียวกับที่ใช้แช่ซิลิกาเจล

2.10.2.2 การทำให้อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกบริสุทธิ์

เพาะเลี้ยงเชื้อรา Absidia sp. BA 16 ตามวิธีในข้อ 2.3 ที่อุณหภูมิและช่วงเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.9 สกัดกรดน้ำดีตามวิธีในข้อ 2.4 ละลายสารที่จะทำการแยกด้วยเอทธานอลปริมาตร 10-15 มิลลิลิตร บรรจุสารละลายนี้ลงในคอลัมน์เหนือซิลิกาเจลซึ่งเตรียมไว้ตามข้อ 2.10.2.1 ผ่านระบบตัวทำละลายที่ใช้ลงในคอลัมน์อย่างต่อเนื่อง เก็บสารที่ผ่านจากคอลัมน์ลงในหลอดแก้วโดยใช้เครื่อง fraction collector ปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อหลอด ตรวจหาอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกในหลอดแก้วที่เก็บ ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบางตามวิธีในข้อ 2.5 นำหลอดแก้วที่พบอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่สนใจมารวมกันแล้วระเหยเอาตัวทำละลายออก

2.10.2.3 การตกผลึก (crystrallization)(11)

นำสารที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ตามข้อ 2.10.2.2 มาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยการตกผลึก ซึ่งทำโดยนำสารมาเติมเอทธิลอซีเตทปริมาตรน้อยที่สุดที่จะทำให้สารนี้ละลายได้หมดขณะร้อน นำไปอุ่นในน้ำเดือดจนกระทั่งได้สารละลายใส หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 วัน หากยังไม่เกิดผลึกให้ทำการลดอุณหภูมิของสารละลายลง หาก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ยังไม่เกิดการตกผลึกก็เติมเฮกเซนทีละหยดจนกระทั่งสารละลายเริ่มขุ่น หยดเอทธิลอซีเตททีละหยดจนสารละลายใสอีกครั้ง เก็บสารละลายนี้ไว้ในที่อุณหภูมิต่ำ เมื่อได้ผลึกแล้วทำการตกผลึกซ้ำ (recrystallization) อีก 2-3 ครั้ง โดยทำตามวิธีเดิมจนได้ผลึกรูปเข็มสีขาว

2.11 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลึก

2.11.1 โดยวิธีตรวจหาจุดหลอมเหลว

นำอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่บริสุทธิ์มาอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที บดให้ละเอียดแล้วบรรจุลงในหลอดแก้วสำหรับตรวจหาจุดหลอมเหลว (capillary tube) ให้ได้ความสูงพอประมาณ นำไปหาจุดหลอมเหลวโดยใช้วิธีแคปปิลารี (capillary method) ด้วยเครื่องตรวจหาจุดหลอมเหลว

2.11.2 โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง

นำอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่บริสุทธิ์มาละลายด้วยเอทธานอลให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาตรวจหาความบริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบางดังกล่าวในข้อ 2.5.2 นับจำนวนจุดที่ปรากฏบนแผ่นโครมาโตแกรม

2.11.3 โดยวิธีแกสโครมาโตกราฟี

เตรียมอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่บริสุทธิ์ให้ได้ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมกรดดีออกซีโคลิกความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ระเหยเอาตัวทำละลายออกจนแห้ง เตรียมอนุพันธ์เอสเตอร์ของกรดน้ำดีตามข้อ 2.7.2 ตรวจหาความบริสุทธิ์ของผลึกโดยเครื่องแกสโครมาโตกราฟตามวิธีในข้อ 2.7.1 และ 2.7.3 โดยนับจำนวนพีคที่ปรากฏ และคำนวณหาพื้นที่ใต้พีคของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้พีคของกรดดีออกซีโคลิก

2.11.4 <u>โดยวิธีไฮเพอร์ฟอแม็นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี</u> (41)

เครื่องไฮเพอร์ฟอแม็นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟประกอบด้วยคอลัมน์ชนิด Zorbax-ODS ขนาด 4.6 มิลลิเมตร × 25 เซนติเมตร ตัวทำละลายที่ใช้ชะสารคือ เมทธานอลต่อน้ำอัตราส่วน 4 ต่อ 1 พีเอชเท่ากับ 4.5 (โดยปรับด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5) ตรวจวัดกรดน้ำดีภายหลังที่แยกผ่านคอลัมน์ด้วยเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลท (ultraviolet detector) ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

เตรียมสารละลายของกรดน้ำดีโดยละลายกรดน้ำดีด้วยเมทธานอลให้ได้ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรที่ใช้ฉีด คือ 5 ไมโครลิตรนับจำนวนพีคที่ปรากฏและระยะเวลาที่พีคต่าง ๆ ปรากฏขึ้นนับตั้งแต่เริ่มฉีดสารซึ่งจะแสดงถึงเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของกรดน้ำดีต่าง ๆ

2.12 <u>การหาโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก</u>

2.12.1 <u>โดยเครื่องวิเคราะห์ธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ออกซิเจน</u>

นำอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่บริสุทธิ์ประมาณ 10 มิลลิกรัม มาตรวจหาธาตุองค์ประกอบ โดยใช้สภาวะการตรวจหาดังนี้

อุณหภูมิของการเผาไหม้ (conbustion temperature) 950 องศาเซลเซียส

ความดันของแกสฮีเลียม (helium pressure) 17.0 พีเอสไอ

ความดันของแกสออกซิเจน (oxygen pressure) 17.0 พีเอสไอ

2.12.2 <u>โดยเครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์</u>

ทำการตรวจหามวลโมเลกุลและการจัดเรียงตัวของอะตอมต่าง ๆ ใน

การตรวจหาโครงสร้างทางเคมีโดยเครื่องมือต่าง ๆ ตามวิธีในข้อ 2.12 โดยเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและการตรวจหาโครงสร้างโดยเครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ได้รับความช่วยเหลือจากมหาวิทยาลัยโอซากา ประเทศญี่ปุ่น

โมเลกุลโดยเครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ รุ่น M-80 ด้วยวิธี direct ionization อุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้สารกลายเป็นไอ คือ 250 องศาเซลเซียส

2.12.3 <u>โดยเครื่องอุลตราไวโอเลท-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์</u>

เตรียมกรดน้ำดีมาตรฐาน คือ กรดลิโทโคลิก กรดดีโนดีออกซีโคลิกและกรดอูโซดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์ของกรดลิโทโคลิกที่บริสุทธิ์ให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้กรดซัลฟูริคเข้มข้นเป็นตัวทำละลาย วัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลท โดยกราด (scan) ตั้งแต่ความยาวคลื่น 800 นาโนเมตร จนถึง 200 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอุลตราไวโอเลท-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น 240 A

2.12.4 <u>โดยเครื่องอินฟราเรดสเปคโตรโฟโตมิเตอร์</u>

ชั่งอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่บริสุทธิ์ประมาณ 1-5 มิลลิกรัม บดเข้ากับนูจอล (nujol) ปริมาณเล็กน้อยให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ป้ายส่วนผสมนี้ลงบนเซลโซเดียมคลอไรด์

ตรวจหาหมู่ฟังชันของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกโดยเครื่องอินฟราเรดสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น IR-440 กราด (scan) ตั้งแต่เลขคลื่น 4000-400 $ซ.ม.^{-1}$

2.12.5 <u>โดยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปคโตรมิเตอร์</u>

นำอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกมาละลายในเมทธานอลที่อะตอมของไฮโดรเจนถูกแทนที่ด้วยดิวทีเรียม (deutero-methanol) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาตรวจวัดโดยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปคโตรมิเตอร์ รุ่น FX-90 Q สารอ้างอิงภายใน (internal reference) คือ เตตราเมทธิลไซเลน (tetramethylsilane) สเปคตรัมของโปรตรอนนิเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์จะแสดงจำนวนไฮโดรเจนและชนิดของไฮโดรเจน สเปคตรัมของคาร์บอน -13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์จะบอกจำนวนคาร์บอนและตำแหน่งในโมเลกุล