บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์สาร

3.1.1 เครื่องเขย่าสำหรับสกัดแยกสาร รุ่น V-ON ของบริษัท Iwaki ประเทศญี่ปุ่น

3.1.2 เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน รุ่น RE-52 ของ Yamato ประเทศญี่ปุ่น

3.1.3 เครื่องเก็บปริมาตรย่อย รุ่น D-180 ของบริษัท Elyela ประเทศญี่ปุ่น

3.1.4 ปั๊ม (Fumilap pump) รุ่น Osy-1 ของบริษัท Fluid metering ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.5 อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ รุ่น TU-160 ของบริษัท Techne ประเทศอังกฤษ

3.1.6 เครื่องเขย่า รุ่น G-560 E ของบริษัท Scientific industries

3.1.7 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WRT ของบริษัทInform ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.1.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น V3100 ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

3.1.9 เครื่อง Ultrasonicator รุ่น D G-1 ประเทศไต้หวัน

3.1.10 High Performance Liquid Chromatograph รุ่น LC-6A ของ
บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

3.1.11 คอลัมน์ชนิดวิเคราะห์ยี่ห้อ ZORBAX(LC-ODS.Steel) ขนาด 250x4.6 มิลลิเมตร

3.1.12 คอลัมน์แก้วชนิดเก็บลำดับส่วนยี่ห้อ Shimpack (LC-ODS.Steel) ขนาด 250x30
มิลลิเมตร

3.1.13 คอลัมน์แก้วขนาด 2.5x100 เซ็นติเมตร

3.1.14 หลอดขนาดแคปปิลลารี ขนาด 5 ไมโครลิตร ของบริษัท Becton, Dickinson
ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2 สารเคมี

3.2.1 เฮกเซน(hexane) ใช้ Commercial grade, Analytical grade ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

3.2.2 โทลูอีน(toluene) ใช้ Commercial grade, Analytical grade ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

3.2.3 เมทธานอล(methanol) ใช้ Commercial grade, Analytical grade และ HPLC grade ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

3.2.4 ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) ใช้ Analytical grade ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

3.2.5 คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (carbontetrachloride) ใช้ Analytical gradeของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

3.2.6 อะซีโตไนตริล (acetonitrile) ใช้ HPLC grade ของบริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.7 เอทธิลอะซิเตต(ethyl acetate) ใช้ Commercial grade ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

3.2.8 คลอโรฟอร์ม (chloroform)ใช้ Analytical grade ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

3.2.9 สารมาตรฐานอะซาไดแรคทิน (Azadirachtin), purity 95% ของบริษัท International Ltd. ประเทศอังกฤษ

3.2.10 ซิลิกาเจล (silica gel)ชนิด 60 Art 7731 สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของบริษัท E.Merck Darmstads

3.2.11 เซฟาเดกซ์(Sephadex) LH-20Code no. 17-0090-01 ของบริษัท Phamacia Biotech AB ประเทศสวีเดน

3.2.12 แผ่นทินแลร์โครมาโตกราฟี ซิลิกาเจล 60 F_{254} ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

3.3 เทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 ควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (QUICK COLUMN CHROMATOGRAPHY)

วิธีนี้มักจะใช้ในการแยกสารออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆก่อน ตามความมีขั้วของสารเพื่อความรวดเร็ว แล้วจึงนำสารกลุ่มใหญ่นั้นไปแยกให้ได้สารที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น ด้วยวิธีที่เหมาะสมต่อไป

วิธีเตรียม ใช้บุชเนอร์ (BUCHNER) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร เป็นคอลัมน์ นำบุชเนอร์วางลงบนขวดดูด (SUCTION FLASK) ซึ่งต่อกับปั๊มน้ำโดยมีจุกยางรองรับ เปิดปั๊มน้ำ บรรจุซิลิกาเจล ชนิด 60 G ART 7731 ซึ่งใช้เป็นตัวดูดซับลงในบุชเนอร์ให้สูงประมาณ 4 เซนติเมตร ระหว่างบรรจุซิลิกาเจลต้องกดให้แน่น และเกลี่ยผิวหน้าให้เรียบ จากนั้นเทตัวทำละลายลงบนผิวหน้าซิลิกาเจล เพื่อให้ตัวทำละลายไหลผ่านลงขวดดูด ซึ่งจะทำให้ซิลิกาเจลอัดตัวแน่นยิ่งขึ้น นำสารสกัดที่ต้องการแยก มาคลุกกับซิลิกาเจลให้เข้ากันจนร่วน บดให้ละเอียดบรรจุลงในคอลัมน์ แล้วกดผิวหน้าให้เรียบ ปิดผิวหน้าด้วยกระดาษกรอง ชะคอลัมน์ที่เตรียมเรียบร้อยแล้วด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารครั้งละเท่า ๆ กัน

3.3.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (COLUMN CHROMATOGRAPHY)

ใช้คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.0 เซนติเมตร ยาว 60 เซนติเมตร อัตราส่วนตัวดูดซับ ต่อสารที่ต้องการแยกประมาณ 20 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก

วิธีเตรียม นำคอลัมน์แก้วมาอุดปลายด้านล่างด้วยสำลีที่สะเดาจำนวนเล็กน้อย ใช้แท่งแก้วดันสำลีให้อยู่ที่ปลายด้านล่าง แล้วบรรจุตัวทำละลายลงไปประมาณครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ เปิดจุกให้ตัวทำละลายไหลออกจากคอลัมน์ช้า ๆ เพื่อไล่ฟองอากาศ และป้องกันไม่ให้สำลีลอย จากนั้นผสมซิลิกาเจล ชนิด 60 ART 7731 กับตัวทำละลาย คนให้เข้ากัน แล้วนำไปบรรจุลงในคอลัมน์ค่อย ๆ บรรจุซิลิกาเจลนั้นลงไปให้ติดต่อและสม่ำเสมอ พร้อมทั้งเปิดคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้า ๆ และคอยปรับให้ผิวหน้าเรียบโดยเคาะคอลัมน์เบา ๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลลงไปจนเหลือประมาณ 5 เซนติเมตรเหนือผิวซิลิกาเจลจึงปิดจุก นำสารสกัดที่ต้องการแยกมาคลุกกับ

ซิลิกาเจลให้เข้ากันจนร่วน แล้วบรรจุลงในคอลัมน์ช้า ๆ โดยไม่ให้ฟองอากาศและให้ผิวหน้าเรียบ ล้างผิวภายในคอลัมน์ให้สะอาดด้วยตัวทำละลายเดิม แล้วปล่อยให้ระดับของตัวทำละลายลดลงจนเกือบถึงผิวหน้าของซิลิกาเจลอีกครั้ง แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการแยกสารต่อไป

3.3.3 ทินแลร์โครมาโทกราฟี (THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY)

การเตรียมภาชนะสำหรับ DEVELOP ใช้ขวดแก้วสะอาดที่มีฝาปิดสนิทขนาดพอเหมาะที่จะใส่แผ่นทินแลร์โครมาโทกราฟีสำเร็จรูปชนิด ซิลิกาเจล 60 F_{254} ได้ ใส่กระดาษกรองให้ทาบผิวด้านในขวด เติมตัวทำละลายที่จะใช้ DEVELOP ลงในขวดให้สูงประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดฝาขวด เอียงขวดให้ตัวทำละลายเปียก กระดาษกรองให้ทั่วแผ่น ทิ้งไว้ 1/2 ชั่วโมง เพื่อให้ในขวดอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

การแต้มสาร ใช้หลอดแคปิลลารี(CAPILLARY TUBE) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 0.05 เซนติเมตร แต้มสารที่ต้องการทดสอบลงบนโครมาโทเพลท โดยให้จุดเริ่มต้นห่างจากขอบล่าง และขอบข้างประมาณ 1 ชั่วโมง สารแต่ละจุดห่างกันไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร ด้านบนขีด SOLVENT FRONT ที่ต้องการไว้ ปล่อยให้จุดของสารละลายที่แต้มแห้งสนิท แล้วจึงนำไปทำการ DEVELOP

การ DEVELOP จุ่มโครมาโทเพลทที่แต้มสารเรียบร้อยแล้ว ลงในขวดแก้วที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายที่เหมาะสม ปิดฝาทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปจนถึงขีด SOLVENT FRONT จึงเอาโครมาโทเพลทออกจากขวดแก้ว ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้ง นำไปตรวจหาตำแหน่งของสารโดยการใช้ไอของไอโอดีนเป็นตัวตรวจสอบ ทำได้โดยการนำโครมาโทเพลทที่ DEVELOP แล้วใส่ในขวดที่มีเกล็ดไอโอดีน บริเวณที่มีสารจะเห็นเป็นสีต่าง ๆ ชัดเจน

3.3.4 การเตรียมตัวอย่างโดย Solid Phase Extraction (SPE)

Solid Phase Extraction (SPE) เป็นวิธีหนึ่งซึ่งใช้หลักการ partition เหมือนกับวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย แต่ต่างกันที่ใช้ของแข็งเป็นตัวจับสารที่เราสนใจ โดยของแข็งจะถูกบรรจุในแท่ง SPE เรียกว่า Sep-Pak

ขั้นตอนการใช้งานทั่วไปของ Sep-Pak Cartiridge

1. การทำความสะอาดตัวอย่าง เป็นวิธีที่ใช้มากที่สุดในการกำจัดสิ่งเจือปนที่ไม่ต้องการออกจากตัวอย่างเพื่อเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการคำนวณทางด้านปริมาณวิเคราะห์ ซึ่งจะใช้ได้ดีกับตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย

2. การเตรียมสารตัวอย่างที่ยุ่งยากซับซ้อน เช่นตัวอย่างที่มีโปรตีนสูง ได้แก่ตัวอย่างประเภทเนื้อเยื่อต่างๆ ซึ่งก่อนที่จะนำตัวอย่างผ่าน Sep-Pak ต้องมีการปรับสภาพของตัวอย่างให้เหมาะสมเสียก่อน โดยทำให้เนื้อเยื่ออยู่ในรูปของสารละลายโดยนำไปย่อยเป็นต้น สารที่ได้หลังจากการย่อยมักจะประกอบไปด้วยสารประกอบหลายชนิดที่มีคุณสมบัติต่างกัน ถ้านำมาฉีดเข้าสู่ระบบ HPLC โดยไม่ผ่าน Sep-Pak อาจเกิดปัญหาของการแยกของพีคไม่ชัดเจน

3. การเตรียมสารตัวอย่างที่มีปริมาณต่ำ ได้แก่ตัวอย่างทางด้านสิ่งแวดล้อมในการเตรียมสารตัวอย่างโดยใช้ Sep-Pak มีวิธีในการเลือกโดยพิจารณาจากคุณสมบัติของสารตัวอย่าง-ตรวจสอบคุณสมบัติของสารตัวอย่างทั้งหมด ได้แก่ คุณสมบัติการละลาย ความมีขั้ว-ไม่มีขั้ว ความเสถียรของสารตัวอย่างเป็นต้น

- เลือกชนิดของ Sep-Pak ให้เหมาะสมกับสารตัวอย่าง โดยให้สารที่สนใจสามารถจับกับpacking ที่บรรจุใน Sep-Pak ได้หรืออาจพิจารณาจากระบบ HPLC ที่มีอยู่ เช่น Reverse phaseหรือ Normal Phase

- เลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการใส่ตัวอย่างลงใน Sep-Pak และเลือกตัวทำละลายที่ใช้ชะสารออกจาก Sep-Pak

Sep-Pak นี้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งจะช่วยให้การเตรียมสารตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยระบบ HPLC เป็นเรื่องที่ง่ายขึ้นเพราะเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว ประหยัด ปลอดภัย ใน

การทำงาน สามารถนำไปใช้กับตัวอย่างได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังจะช่วยให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

3.3.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐานอะซาไดแรคทินเพื่อทำกราฟมาตรฐานในการหาความเข้มข้นของสารสกัดสะเดาและอะซาไดแรคทินที่สกัดได้จากเมล็ดสะเดา

เตรียมสารละลายมาตรฐานอะซาไดแรคทินที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 20 ถึง 125 ไมโครลิตร แล้วฉีดสารละลายแต่ละความเข้มข้นเข้าเครื่อง นำพื้นที่ใต้พีคในแต่ละความเข้มข้นของสารละลาย มาลากกราฟมาตรฐาน (standard calibration curve)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

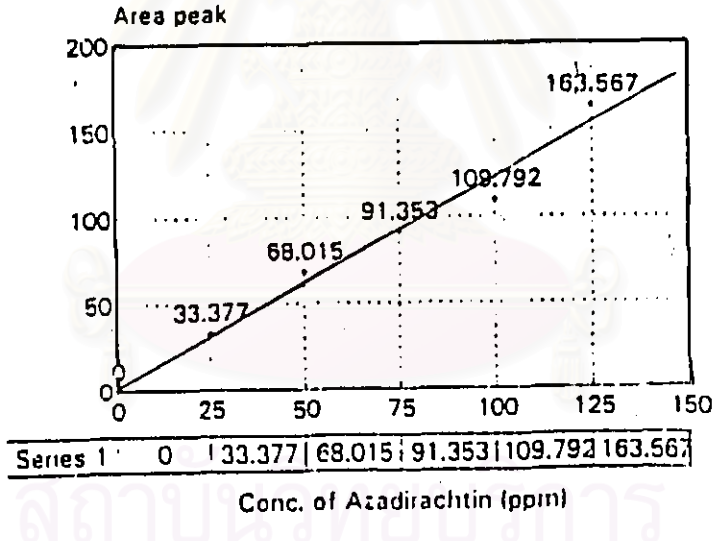
3.3.5.1 สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐาน (calibration curve) และวิเคราะห์และหาปริมาณอะซาไดแรคทินที่ได้จากการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายร่วม และโดยวิธีใช้ soxhlet การวิเคราะห์สารซึ่งได้จากการเตรียมอนุพันธ์อะซาไดแรคทินด้วยเอนไซม์ดังนี้

คอลัมน์ :	คอลัมน์สำหรับวิเคราะห์ (analytical column) Zorbax (LC-ODS, STEEL, 150 x 4.6 มิลลิเมตร)
สารละลายตัวพา :	อะซิโตไนตริล 40% ในน้ำ
สารละลายตัวล้าง :	เมทธานอล 80% ในน้ำ
อัตราการไหล :	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
ความดัน :	8.0 บาร์
ปริมาณที่ใช้วิเคราะห์:	10 ไมโครลิตร
อุณหภูมิ	25 องศาเซลเซียส
ตัวทำละลายสารตัวอย่าง :	เมทธานอล
ความยาวคลื่นในการตรวจวัด	210 นาโนเมตร
การคำนวณ	พื้นที่ใต้พีค
เวลาในการวิเคราะห์:	40 นาที
Sensitivity	0.8 AUFS.
Attenuation	4
การวิเคราะห์เป็นแบบ	Isocratic

จากภาพที่ 1(ภาคผนวก) แสดงให้เห็นว่าความยาวคลื่นสูงสุดที่ใช้ในการตรวจวัด = 210 นาโนเมตร โดยการทดลองจากอะซาไดแรคทิน 0.005 กรัม ละลายในเมทธานอล 3 มิลลิลิตร

ตารางที่ 2 แสดงความเข้มข้นต่างๆของสารละลายมาตรฐานอะซาไดแรคทินกับพื้นที่ใต้พีคที่ retention time ของอะซาไดแรคทิน

ความเข้มข้นของสารละลาย (ppm)	พื้นที่ใต้พีค
25	33,377
50	68,015
75	91,353
100	109,792,
125	163,567



HPLC , Flow rate 1.0 ml/min.

รูปที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอะซาไดแรคทินกับพื้นที่ใต้พีค

จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้ 10 ไมโครลิตรฉีดเข้าเครื่อง แล้วนำพื้นที่ใต้พีคที่ได้มาหาความเข้มข้น เพื่อหาปริมาณอะซาไดแรคทิน

3.3.6.การเตรียมสารละลายตัวพาและสารละลายตัวอย่างก่อนเข้าเครื่องHPLC(High Performance Liquid Chromatography)

3.3.6.1 การเตรียมสารละลายตัวพา

สารละลายตัวพาที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ เมทธานอล อะซิโตไนตริล และ น้ำ เมทธานอลที่ใช้เป็นประเภท HPLC grade และ Analytical grade โดยก่อนใช้จะกรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตต ขนาด 47 มิลลิเมตร น้ำที่ใช้เป็นน้ำกลั่นที่ผ่านการเอาอิออนออกจากน้ำ 2 ครั้ง (double deionize water) และอะซิโตไนตริลใช้เป็น HPLC grade และ Analytical grade โดยก่อนใช้กรองผ่านกระดาษกรอง PTFE ขนาด 47 มิลลิเมตร

3.3.6.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำตัวอย่างมาละลายด้วยเมทธานอล กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตต ขนาด 13 มิลลิเมตร แล้วผ่าน Sep-pak C_{18} cartridge ปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 1 มิลลิลิตร สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณอะซาไดแรคทิน หรือปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 5.0 มิลลิลิตร สำหรับการเก็บลำดับส่วน HPLC เพื่อทำอะซาไดแรคทินให้บริสุทธิ์

3.3.7 การหาปริมาณอะซาไดแรคทิน โดยใช้ HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

การวิเคราะห์และหาปริมาณอะซาไดแรคทิน โดยHPLC จะใช้คอลัมน์สำหรับวิเคราะห์ (analytical column) จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมได้ปรับชนิดและความเข้มข้นของสารละลายตัวพาในอัตราการไหลที่เท่ากันคือ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีพบว่าที่อะซาไดแรคทินออกจากคอลัมน์ในสภาวะที่ต่างกัน ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3. แสดงเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ ในสภาวะที่ต่างกัน

ชนิดและความเข้มข้นของสารละลายตัวพา	อัตราการไหล	เวลาที่อยู่ในคอลัมน์
40% อะซีโตไนตริลในน้ำ	1 มิลลิลิตรต่อนาที	11 นาที
50% เมทธานอลในน้ำ	0.5 มิลลิลิตรต่อนาที	49 นาที
60% เมทธานอลในน้ำ	0.5 มิลลิลิตรต่อนาที	38 นาที
70% เมทธานอลในน้ำ	0.5 มิลลิลิตรต่อนาที	12 นาที
80% เมทธานอลในน้ำ	0.5 มิลลิลิตรต่อนาที	3.6 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>การคำนวณหาปริมาณอะซาไดแรคทิน</u>

การหาปริมาณอะซาไดแรคทินสามารถหาได้จากกราฟมาตรฐานอะซาไดแรคทินดังรูปที่6 โดยสมมุติให้กราฟมาตรฐานมี ความชัน = A ตัวอย่างมีน้ำหนัก B กรัม ละลายในตัวทำละลาย 1 มิลลิลิตร แล้วใช้หลอดฉีดขนาด 10 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC และจากโครมาโทแกรมได้พื้นที่ใต้พีค = C

ความเข้มข้นของอะซาไดแรคทิน = พื้นที่ใต้พีค ÷ความชัน

∴ ความเข้มข้นของอะซาไดแรคทิน = C/A ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร

ในสารละลาย 1 มิลลิลิตร มีปริมาณสารตัวอย่าง B กรัม

สารตัวอย่าง B กรัม มีอะซาไดแรคทิน $C/A \times 10^{-6}$ กรัม

สารตัวอย่าง 100 กรัม มีอะซาไดแรคทิน $Cx10^{-6} x100/AxB = Cx10^{-4}/AxB$ กรัม

∴ ปริมาณอะซาไดแรคทิน = $Cx10^{-4}/AxB$ %

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.8 การทำอะซาไดแรคทินให้บริสุทธิ์โดยการเก็บลำดับส่วน จาก HPLC (preparative HPLC) จากการสกัดสารโดยวิธีใช้ตัวทำละลายร่วมและการสกัดสารโดยวิธี soxhlet

● สภาวะของเครื่อง เป็นดังนี้

คอลัมน์ :	คอลัมน์สำหรับเก็บลำดับส่วน (preparative column) Shimpack (LC-ODS, STEEL, 250 x 30 มิลลิเมตร)
สารละลายตัวพา :	อะซีโตไนตริล 30% ในน้ำ
สารละลายตัวล้าง :	เมทธานอล 80% ในน้ำ
อัตราการไหล :	9.9 มิลลิลิตรต่อนาที
ความดัน :	15.0 บาร์
ปริมาณที่ใช้วิเคราะห์:	5.0 มิลลิลิตร
อุณหภูมิ :	25 องศาเซลเซียส
ตัวทำละลายตัวอย่าง :	เมทธานอล
ความยาวคลื่นการตรวจวัด	210 นาโนเมตร
การคำนวณ :	พื้นที่ใต้พีค
เวลาในการวิเคราะห์:	200 นาที
Sensitivity :	0.8 AUFS.
Attenuation :	7-9
การวิเคราะห์เป็นแบบ	isocratic

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

● ขั้นตอนในการทำอะซาไดแรคทินให้บริสุทธิ์โดยการเก็บลำดับส่วน

นำสารตัวอย่างมา 0.2 กรัม ละลายด้วยสารละลายตัวพา 5.0 มิลลิลิตร แล้วผ่านการเตรียมสารละลายตัวอย่างดังการทดลองที่ 3.3.6.2 แล้วฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะของเครื่องข้างต้น เก็บลำดับส่วนของสารละลายลำดับส่วนละ 20 มิลลิลิตร ต่อหลอดทดลอง เก็บลำดับส่วนของสารละลายจนกระทั่งไม่มีพีคของโครมาโทแกรมเกิดขึ้นที่หน้าจอ(recorder) แล้ววิเคราะห์หาสารบริสุทธิ์ โดยรวมลำดับส่วนของสารละลายที่มีโครมาโทแกรมในระยะเวลาเดียวกัน แล้วระเหยเอาตัวทำละลายในแต่ละส่วนออกที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสที่ความดันสูญญากาศ

● **การสกัดแยกอะซาไดแรคทินออกจากเมล็ดสะเดา**

การสกัดแยกอะซาไดแรคทินออกจากเมล็ดสะเดาโดยการทดลอง 2 วิธี

1. ตัวทำละลายโดย soxhlet
2. ด้วยตัวทำละลายร่วม

3.4. การสกัดแยกอะซาไดแรคทินออกจากเมล็ดสะเดา วิธีที่ 1

ขั้นตอนการสกัดแยกอะซาไดแรคทินออกจากเมล็ดสะเดา โดยการเตรียมเมล็ดสะเดา(preparation) แล้วสกัดสารสกัดจากเมล็ดสะเดาด้วยเฮกเซนโดยวิธี Soxhlet ขนาดใหญ่ แล้วนำกากเมล็ดสะเดาที่ได้มาแช่ในเมทธานอล สกัดแยกสารไม่บริสุทธิ์ออกจากสารสกัดสะเดาโดยอาศัยความสมดุลของการกระจายตัวของตัวทำละลายระหว่างเฟส(partition)ด้วยตัวทำละลายต่างๆ แล้วแยกสารของสารสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต-เฮกเซน ทำการแยกสารอื่นออกจากสารสกัดสะเดาในซิลิกา เจลคอลัมน์ โดยใช้สารละลายตัวพาเมทธานอลในโทลูอีนที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 2% จนถึง 9% เพื่อเก็บสารที่อยู่ในช่วงของอะซาไดแรคทิน แล้วทำอะซาไดแรคทินให้บริสุทธิ์ด้วย preparative HPLC โดยการเก็บลำดับส่วนในช่วงพีคของอะซาไดแรคทินเท่านั้น สุดท้ายศึกษาเอกลักษณ์ของสารที่แยกได้จาก preparative HPLC โดยใช้หลักฐานทางเคมี เช่น NMR, MS

3.4.1 การเตรียมเมล็ดสะเดา

นำเมล็ดสะเดาแห้งมากระเทาะเปลือก แยกเอาเนื้อใน เก็บไว้ในห้องเย็น เมื่อจะนำมาใช้ให้บดด้วยเครื่องปั่น (blender) ให้ละเอียด

3.4.2 การสกัดสารสกัดสะเดาโดยวิธี soxhlet ขนาดใหญ่

3.4.2.1 การสกัดด้วยเฮกเซน

ชั่งเมล็ดสะเดาที่ผ่านการเตรียมเมล็ดสะเดาข้างต้นดังในข้อ 3.4.1 4.0 กก. สกัดด้วยเฮกเซนจำนวน 10 ลิตรโดยวิธี soxhlet เป็นเวลา 48 ช.ม. นำสารละลายเฮกเซนมาทดสอบบนแผ่นทินแลร์โครมาโทกราฟีเทียบกับสารมาตรฐานอะซาไดแรคทินดังวิธีที่3.3.3 แล้วกลั่นแยกเอาเฮกเซนออกจนเกือบหมดโดยวิธีกลั่นลดความดันด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุนวิเคราะห์หาปริมาณอะซาไดแรคทิน ตามวิธี 3.3.5-3.3.7 และเก็บกากเมล็ดสะเดาที่ผ่านการสกัดด้วยเฮกเซนไว้

3.4.2.2 การสกัดสารด้วยเมทธานอล

นำกากเมล็ดสะเดาจาก3.4.2.1 มาแช่ในเมทธานอล 95% จำนวน 6 ลิตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายที่สกัดได้มากรอง แล้วกลั่นแยกเอาเมทธานอลออกจนเกือบหมด โดยวิธีกลั่นลดความดันด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส นำเมทธานอลที่กลั่นได้ไปสกัดกากเมล็ดสะเดาซ้ำอีกหลาย ๆ ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง โดยนำสารละลายแต่ละครั้งทดสอบบนแผ่นทินแลร์โครมาโทกราฟี ตามวิธี 3.3.3 จนกระทั่งสารละลายเมทธานอลที่กรองได้ ไม่มีจุดที่ปรากฏบนแผ่นทินแลร์โครมาโทกราฟีในระยะทางของสารตรงกับระยะทางของสารมาตรฐานอะซาไดแรคทินที่เคลื่อนที่ได้ จึงหยุดสกัด นำสารละลายที่สกัดได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกชั่งน้ำหนักสาร และวิเคราะห์หาปริมาณอะซาไดแรคทิน ตามวิธี 3.3.5-3.3.7

3.4.3 การสกัดแยกสารไม่บริสุทธิ์ออกจากสารสกัดสะเดา โดยอาศัยความสมดุลย์ของการกระจายตัวของตัวทำละลายระหว่างเฟส

3.4.3.1 การสกัดด้วยเมทธานอล 95% - เฮกเซน

นำสารสกัดที่ผ่านการสกัดดังในข้อ 3.4.2.2 15 กรัม ละลายด้วยเมทธานอล95% 400 มิลลิลิตรในกรวยแยก(separatory funnel) เติมเฮกเซน 400 มิลลิตร สกัดแยกเมทธานอลด้วยเครื่องเขย่าสำหรับแยกสารเป็นเวลา 10 นาที แยกชั้นเมทธานอลออกจากชั้นเฮกเซน ไขชั้นเมทธานอลมาใส่ในกรวยแยกอีกใบหนึ่ง แล้วเติมเฮกเซน 400 มิลลิลิตรลงในกรวยแยก แล้วสกัดดังวิธีเดิม ทิ้งชั้นเฮกเซน แล้วสกัดด้วยเฮกเซนด้วยวิธีเดิมอีก 2 ครั้ง ครั้งละ 400 มิลลิลิตร นำสารละลายเมทธานอลแต่ละครั้งทดสอบบนแผ่นทินแลร์โครมาโทกราฟี ตามวิธี 3.3.3 จนกระทั่งสารละลายเมทธานอล ไม่มีจุดของอะซาไดแรคทิน จึงหยุดสกัด ไขชั้นสารละลายเมทธานอลมากลั่นลดความดันด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุนที่ อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส นำสารสกัดเมทธานอลมาวิเคราะห์หาปริมาณอะซาไดแรคทิน ตามข้อ 3.3.5-3.3.7

3.4.3.2 การสกัดด้วยน้ำ-เอทธิลอะซิเตต

นำสารสกัดสะเดาเมทธานอลที่สกัดข้างต้น 15 กรัม มาละลายด้วยเอทธิลอะซิเตต 400 มิลลิลิตร เติมน้ำ 400 มิลลิลิตร สกัดในกรวยแยก สกัดแยกสารละลายด้วยเครื่องเขย่าสำหรับสกัดแยกเป็นเวลา 10 นาที แยกชั้นเอทธิลอะซิเตตออกจากชั้นน้ำ แล้วสกัดสารละลายชั้นเอทธิลอะซิเตตด้วยน้ำอีก 3 ครั้ง ครั้งละ 400 มิลลิลิตร นำชั้นเอทธิลอะซิเตตมากำจัดน้ำออกด้วยการเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส แล้วระเหยเอทธิลอะซิเทตออกจนแห้ง โดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส นำไปวิเคราะห์หาปริมาณอะซาไดแรคทิน ตามวิธีข้อ 3.3.5-3.3.7

3.4.4 การแยกสารของสารสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต-เฮกเซน

ชั่งสารสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต จากข้อ 3.4.3 10 กรัม ละลายด้วยสารละลายผสมระหว่างเอทธิลอะซิเทตกับเฮกเซนในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 แล้วแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งมีซิลิกาเจล 50 กรัมเป็นตัวดูดซับตามวิธีในข้อ 3.3.2 แล้วชะคอลัมน์ด้วยสารละลายผสมที่ละลายสารตัวอย่าง เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 200 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละส่วน(fraction)มาทดสอบว่ามีอะซาไดแรคทินหรือไม่โดยใช้ทินแลร์โครมาโทกราฟีตามวิธี 3.3.3 จนกระทั่งสารละลายที่จุดบนแผ่นไม่ปรากฏว่ามีระยะทางของสารตรงกับระยะทางของสารมาตรฐานอะซาไดแรคทินที่เคลื่อนที่จึงหยุดชะคอลัมน์ รวมสารที่เหมือนกันที่เก็บได้เข้าด้วยกัน นำไปกลั่นไล่ตัวทำละลาย ชั่งน้ำหนักสารและวิเคราะห์หาปริมาณอะซาไดแรคทินตามวิธี 3.3.5-3.3.7

3.4.5 การแยกสารอื่นออกจากสารสกัดสะเดาในระบบคอลัมน์

ทำการเตรียมคอลัมน์ดังการทดลองที่ 3.3.2 ซึ่งมีซิลิกาเจลหนัก 200 กรัม เป็นตัวดูดซับล้างคอลัมน์โดยผ่านโทลูอีน 150 มิลลิลิตร อัตราการไหลของสารละลายในคอลัมน์ 1 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วผ่านสารสกัด ข้อ 3.4.4 15 กรัม ซึ่งละลายในโทลูอีน 5 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์ ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายตัวพา ซึ่งแปรอัตราส่วนของสารละลายเมทธานอลในโทลูอีน 2 % ถึง 9% แต่ละส่วนจะใช้ตัวชะ 1000 มิลลิลิตร. เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์เป็นลำดับส่วน 15 มิลลิลิตร ต่อขวดทดลองรวมสารแต่ละส่วนที่มีทินแลร์โครมาโทแกรมเหมือนกันเข้าด้วยกัน เพื่อแยกเอาเฉพาะจุดเดียวที่ตรงกับสารละลายมาตรฐานอะซาไดแรคทิน พร้อมทั้งวิเคราะห์หาอะซาไดแรคทินทุกๆ 5 หลอดทดลองเมื่อพบช่วงที่มีปริมาณอะซาไดแรคทินมาก จะหาปริมาณทุก ๆ หลอดทดลอง รวมสารละลายที่ตรวจพบอะซาไดแรคทินซึ่งมีพีคโครมาโทมาแกรมเหมือนกัน แล้วนำไปกลั่นไล่ตัวทำละลายนำมาวิเคราะห์หาอะซาไดแรคทิน ตามวิธี 3.3.5-3.3.7

I17199414

3.4.6 การทำอะซาไดแรคทินให้บริสุทธิ์ (Purification) ด้วย preparative HPLC

การทำอะซาไดแรคทินให้บริสุทธิ์ (Purification) สามารถทำได้โดยวิธีเก็บลำดับส่วนของสารละลายโดย HPLC

นำสารที่ได้จากการทดลองวิธีข้อ3.4.5 จำนวน 0.5 กรัม มาละลายด้วย เมธานอล 5.0มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตต ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร แล้วผ่าน Sep-pak C_{18} cartridge ปรับสภาวะของเครื่องHPLC ดังข้อ 3.3.4 ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์เป็นลำดับส่วน 20 มิลลิลิตร ต่อ ขวดทดลอง แล้วนำสารละลายในแต่ละขวดมาวิเคราะห์หาอะซาไดแรคทินตามวิธีข้อ 3.3.5-3.3.7 จากโครมาโทแกรมที่ได้จากเครื่อง HPLC รวมลำดับส่วนของสารละลายในแต่ละขวดทดลองที่มีโครมาโทแกรมคล้ายกันแล้วระเหยเอาตัวทำละลายออก ภายใต้ความดันสูญญากาศที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักแต่ละลำดับส่วน หาปริมาณอะซาไดแรคทินดังการทดลองที่ 3.3.5-3.3.7

3.4.7 การศึกษาเอกลักษณ์ของสารที่แยกได้จาก preparative HPLC

วิเคราะห์โครงสร้างโดย NMR [Nuclear Magnetic Resonance]. และ MS(mass spectroscopy)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5. การสกัดแยกอะซาไดแรคทินออกจากเมล็ดสะเดา วิธีที่ 2

ขั้นตอนการสกัด แยกอะซาไดแรคทิน ออกจากเมล็ดสะเดาวิธีที่ 2 ทำโดยการเตรียมเมล็ดสะเดา (Preparation) แล้วสกัดสารจากสะเดาโดยใช้ตัวทำละลายร่วม(co-extraction solvent) ด้วยเฮกเซนและเอทธานอล หลังจากนั้นสกัดแยกสารไม่บริสุทธิ์ออกจากสารสกัดสะเดา โดยอาศัยความสมดุลของการกระจายตัวของตัวทำละลายระหว่างเฟส (Partition) ด้วยตัวทำละลายต่างๆ แล้วแยกสารชนิดอื่นออกจากสารสกัดสะเดาในเซฟ่าเดกซ์คอลัมน์(cleanup) ซึ่งใช้สารละลายผสมระหว่างเมทธานอลในคลอโรฟอร์ม 50 % เป็นสารละลายตัวพา ทำอะซาไดแรคทินให้บริสุทธิ์ด้วยการเก็บลำดับส่วนโดยการทำ preparative HPLC สุดท้ายศึกษาเอกลักษณ์ของสารที่แยกได้จาก preparative HPLC โดยใช้หลักฐานทางเคมี เช่น H-NMR ,C-13-NMR

3.5.1 การเตรียมเมล็ดสะเดา

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

3.5.2 การสกัดสารสกัดจากสะเดาโดยใช้ตัวทำละลายร่วม

นำเมล็ดสะเดาที่เตรียมแล้วจากข้อ 3.4.1 น้ำหนัก 603 กรัม มาแช่ในเอทธานอล 95% จำนวน 820 มิลลิลิตร และเฮกเซน 400 มิลลิลิตร แล้วให้ความร้อนโดยแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง แล้วนำส่วนผสมมากรองเอากากเมล็ดทิ้ง นำสารละลายที่ได้มาหาปริมาณอะซาไดแรคทิน ตามการทดลองวิธีที่ 3.3.5- 3.3.7 ระเหยสารละลายผสมเอทธานอลและเฮกเซนภายใต้ความดันสูญญากาศที่ อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักสารที่ได้

นำสารที่ผ่านการสกัดในข้างต้นมาเติมเฮกเซน 978 มิลลิลิตร จะเกิดตะกอนของแข็งกระจายในชั้นเฮกเซน กรองตะกอน แล้วชั่งน้ำหนัก นำตะกอนที่ได้มาทดสอบหาปริมาณอะซาไดแรคทิน ตามวิธีข้อ 3.3.5-3.3.7

3.5.3 การสกัดแยกสารไม่บริสุทธิ์ออกจากสารสกัดสะเดา โดยอาศัยความสมดุลย์ของการกระจายตัวของตัวทำละลายระหว่างเฟส (Partition)

3.5.3.1 การสกัดด้วยเมทธานอล 95%-เฮกเซน

นำสารสกัด ที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายร่วม ในขั้นต้น 15 กรัม ละลายด้วยเมทธานอล95% 400 มิลลิลิตร ในกรวยแยก(separatory funnel) เติมเฮกเซน 400 มิลลิตร สกัดแยกเมทธานอลด้วยเครื่องเขย่าสำหรับแยกสารเป็นเวลา 10 นาที แยกชั้นเมทธานอลออกจากชั้นเฮกเซน ไขชั้นเมทธานอลมาใส่ในกรวยแยกอีกใบหนึ่ง แล้วเติมเฮกเซน 400 มิลลิลิตรลงในกรวยแยก แล้วสกัดดังวิธีเดิม ทิ้งชั้นเฮกเซน แล้วสกัดด้วยเฮกเซนด้วยวิธีเดิมอีก 2 ครั้ง ครั้งละ 400 มิลลิลิตร นำสารละลายเมทธานอลแต่ละครั้งทดสอบบนแผ่นทินแลร์โครมาโทกราฟี ตามวิธี 3.3.3 จนกระทั่งสารละลายเมทธานอล ไม่มีจุดของอะซาไดแรคทิน จึงหยุดสกัด ไขชั้นสารละลายเมทธานอลมากลั่นลดความดันด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุนที่ อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส นำสารสกัดเมทธานอลมาวิเคราะห์หาปริมาณอะซาไดแรคทิน ตามข้อ 3.3.5-3.3.7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.3.2 การสกัดด้วยน้ำ-เอทธิลอะซิเตต

นำสารสกัดสะเดาเมทธานอลที่สกัดข้างต้น 15 กรัม มาละลายด้วยเอทธิลอะซิเตต 400 มิลลิลิตร เติมน้ำ 400 มิลลิลิตร สกัดในกรวยแยก สกัดแยกสารละลายด้วยเครื่องเขย่าสำหรับสกัดแยกเป็นเวลา 10 นาที แยกชั้นเอทธิลอะซิเตตออกจากชั้นน้ำ แล้วสกัดสารละลายชั้นเอทธิลอะซิเตตด้วยน้ำอีก 3 ครั้ง ครั้งละ 400 มิลลิลิตร นำชั้นเอทธิลอะซิเตตมากำจัดน้ำออกด้วยการเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส แล้วระเหยเอทธิลอะซิเตตออกจนแห้ง โดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส นำไปวิเคราะห์หาปริมาณอะซาไดแรคทินตามวิธีข้อ 3.3.5-3.3.7

3.5.4. การแยกสารอื่นออกจากสารสกัดสะเดาในระบบคอลัมน์ (Clean up)

ในการแยกสิ่งสกปรกออกจากสารสกัดสะเดาจะผ่านคอลัมน์ ซึ่งมีเซฟาเดกซ์เป็นสารดูดซับในคอลัมน์ตามวิธี 3.3.2 ชั่งสารสกัดสะเดา 5.0 กรัม มาละลายด้วยตัวทำละลายตัวพาคือสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทธานอล ในอัตราส่วน 50 เปอร์เซนต์ปริมาณน้อยที่สุด บรรจุสารสกัดนี้ลงในคอลัมน์ โดยให้อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์เป็นลำดับส่วน ลำดับส่วนละ 15 มิลลิลิตร ต่อหลอดทดลอง แล้วทดสอบสารแต่ละหลอดบนแผ่นทินแลร์โครมาโทกราฟี (TLC) ตามวิธีข้อ 3.3.3 จนกระทั่งสารละลายในแต่ละหลอดทดลองไม่มีระยะทางที่ตรงกับจุดของสารละลายมาตรฐานอะซาไดแรคทินที่ปรากฏ จึงหยุดผ่านการชะ

จากลำดับส่วนของสารละลายที่เก็บได้ นำสารละลายในแต่ละหลอดมาวิเคราะห์หาอะซาไดแรคทิน โดยเครื่อง HPLC (Analytical Column) โดยการเก็บรวมลำดับส่วน จากโครมาโทแกรมที่มีลักษณะคล้ายกัน แล้วระเหยเอาตัวทำละลายในแต่ละส่วนออก ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ที่ความสูญญากาศ แล้ววิเคราะห์หาปริมาณอะซาไดแรคทินตามวิธีข้อ 3.3.5-3.3.7

3.5.5 การทำอะซาไดแรคทินให้บริสุทธิ์ ด้วย preparative HPLC

นำสารที่ได้จากการทดลอง 3.5.4 น้ำหนัก 0.2 กรัม ละลายด้วยอะซิโตไนตริล 5.0 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บลำดับส่วนโดย HPLC ดังวิธีข้อ 3.3.8 นำสารอะซาไดแรคทินที่ได้ชั่งน้ำหนักและวิเคราะห์หาปริมาณอะซาไดแรคทิน

3.5.6 การศึกษาเอกลักษณ์ของสารที่แยกได้จาก preparative HPLC

วิเคราะห์โครงสร้างอะซาไดแรคทินโดยเทคนิคNMR (Nuclear Magnetic Resonance)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 การศึกษาปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสกับอะซาไดแรคทินตัวหนึ่ง

●เอนไซม์ที่ในการศึกษา 2 ชนิด คือ

1. ไลเปส แคนดิดา (Candida lipase)
2. ไลเปส ไรโซพัส (Rhizopus lipase)

●คุณสมบัติของ ไลเปส แคนดิดา

เป็นของแข็ง 60,000 หน่วยต่อมิลลิกรัม มีจำนวนหน่วยทั้งหมด 1,080,000 หน่วย อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ชนิดนี้ คือ 37 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดด่าง (pH) ที่ดีที่สุดที่ 7.2

●คุณสมบัติของไลเปส ไรโซพัส

มีความเข้มข้น 428,866.5 หน่วยต่อ 50 ไมโครลิตร 8577 หน่วยต่อไมโครลิตร อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ชนิดนี้ คือ 37 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดด่าง (pH) ที่ดีที่สุดที่ 7.7

3.6.1 การเตรียมสารละลายแต่ละชนิด

3.6.1.1 การเตรียม stock reagent สำหรับไลเปส ไรโซพัส

นำโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH =6.0 ละลายกลีเซอรอล 0.4 มิลลิลิตรและน้ำ 1.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลีเซอรอล 20 % ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH =6.0

นำไลเปส ไรโซพัส 0.05 มิลลิลิตร สารละลายในกลีเซอรอล 20 % ในโปตัสเซียมฟอสเฟต 10 มิลลิโมลาร์ pH =6.0 จะได้ stock reagent มีความเข้มข้น 2860 หน่วยต่อไมโครลิตรแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20° ซ.

3.6.1.2 การเตรียม working reagent สำหรับเอนไซม์ไรโซพัส ไลเปส

นำไลเปส ไรโซพัส ที่ได้จาก stock reagent 10 ไมโครลิตร เติมลงในโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ pH=6.0 90 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นของไรโซพัส 286 หน่วยต่อไมโครลิตร

3.6.1.3 การเตรียม stock reagent สำหรับไลเปส แคนดิดา

นำโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH=7.2 ละลายกลีเซอรอล 0.4 มิลลิลิตรและน้ำ 1.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลีเซอรอล 20% ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตรโมลาร์ pH=7.2

3.6.1.4 การเตรียม working reagent สำหรับไลเปส แคนดิดา

นำไลเปส แคนดิดา เข้มข้น 2160 หน่วยต่อไมโครลิตร ที่ได้จาก stock reagent 10 ไมโครลิตร เติมลงในโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ pH=7.2 90 ไมโครลิตร จะได้สารละลายแคนดิดา ไลเปสเข้มข้น 216 หน่วยต่อไมโครลิตร

3.5.1.5 การเตรียมสารละลายอะซาไดแรคทินเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อ1 มิลลิลิตร ในเอทธานอล 25%

ละลายอะซาไดแรคทินตัวหนึ่งซึ่งมี 0.0156 กรัม retention time =14 (ใน HPLC) ในเอทธานอล95% 0.78 มิลลิลิตร และน้ำ 0.78 มิลลิลิตร จะได้สารละลายอะซาไดแรคทินเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อเอทธานอล 50% 1 มิลลิลิตร แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายที่ได้ข้างต้นมา 25 ไมโครลิตร ละลายในน้ำ 25 ไมโครลิตร ได้สารละลายอะซาไดแรคทินเข้มข้น 5 มิลลิกรัม

3.6.2 การทดลองปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะซาไดแรคทินกับไลเปส ไรโซพัส

3.6.2.1 การเตรียมสารละลายอะซาไดแรคทินสำหรับใช้กับไลเปส ไรโซพัส

ละลายสารละลายอะซาไดแรคทิน 50 ไมโครลิตรจากสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมได้ข้างต้น โปตัสเซียมฟอสเฟต, pH =7.7 ,50 มิลลิโมลาร์, 0.55 มิลลิลิตร

3.6.2.2 การเตรียมสารละลายอะซาไดแรคทินสำหรับใช้กับไลเปส แคนดิดา

ละลายสารละลายอะซาไดแรคทิน 50 ไมโครลิตรจากสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมได้ข้างต้น โปตัสเซียมฟอสเฟต, pH =7.2 ,50 มิลลิโมลาร์, 0.55 มิลลิลิตร

●การบ่มเอนไซม์

เติมเอนไซม์ไรโซพัสที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.1.2 10 ไมโครลิตร มาละลายในสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.2.1 แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ช.ม., 4 ช.ม., และ 24 ช.ม. หยุดปฏิกิริยาด้วยเอทธิลอะซิเตตอีก 3 ครั้ง เก็บรวมชั้นเอทธิลอะซิเตต แล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยความดันสูญญากาศอุณหภูมิ 33°ซ นำสารสกัดที่ได้มาละลายในอะซิโตไนตริล 300 ไมโครลิตร แล้วทดสอบปฏิกิริยาจากเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะการทดลองเครื่องดังในข้อ 3.3.5.1

สำหรับการทดลองด้วย ไลเปส แคนดิดา ก็ทำในลักษณะเดียวกับการทดลองข้างต้น โดยการเปลี่ยนตัวเอนไซม์ และสารละลาย blank จะไม่เติมเอนไซม์แต่จะเติมน้ำลงไปแทน