บทที่ 4

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

4.1 อุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (4 – digits balance) ของบริษัท Mettler-Toledo, Switzerland.
2. เครื่องกวนแม่เหล็กพร้อมเตาให้ความร้อน(magnetic stirrer / hot plate) ของบริษัท Ika Labortechnik, Germany.
3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น MP 220 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Kubota 5100 ของบริษัท Kubota corporation, Japan.
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Instrument, USA.
6. อ่างเขย่าและควบคุมอุณหภูมิ (water bath shaker) รุ่น XY-80 ของบริษัท Itochu corporation, Japan.
7. ปั๊มรีด(peristaltic pump) รุ่น 505 U ของบริษัท Watson-Marlow Limited, England.

4.2 เคมีภัณฑ์

1. กรดไฮโดรคลอริก 37 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร(HCl) ของบริษัท BDH Laboratory, England.
2. กรดฟอสฟอริก(H_3PO_4) ของบริษัท Lipton Manufacturing Chemists, England.
3. กรดไตรคอลโรอะซีติก(TCA) ของบริษัท Merck, Germany.
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) ของบริษัท Merck, Germany.
5. โบวีนซีรัมอัลบูมิน(BSA) ของบริษัท Fluka, Switzerland.
6. พอลีเอทิลีนไกลคอล น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 1000(PEG 1000) ของบริษัท Dow Chemical, U.S.A
7. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(K_2HPO_4) ของบริษัทYoung Jin Chemical Limited, Korea
8. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต(KH_2PO_4) ของบริษัทYoung Jin Chemical Limited, Korea
9. เอโซเคซีน(azocasine) ของบริษัท Sigma, Germany.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. โคมาเซ บิเลียนบลู จี 250(comasie billent blue G 250) ของบริษัท Ajax, Australia. ซึ่งสารเคมีทั้งหมดมีความบริสุทธิ์ระดับห้องปฏิบัติการยกเว้น พอลีเอทิลีนไกลคอล 1000, ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ซึ่งมีความบริสุทธิ์ระดับการค้า

4.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

วิธีการหาภาวะที่เหมาะของการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในหอสกัดชนิดโอลชูรัชตันขนาด 5.7 ลิตรมีวิธีการดำเนินงานวิจัย โดยแบ่งออกเป็นปัจจัยต่างๆ ดังนี้

4.3.1 การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดเอมไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดโอลชูรัชตันขนาด 5.7 ลิตร

4.3.1.1 การหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆของน้ำหมักในถังป้อนก่อนเข้าหอสกัด

ทำการเก็บตัวอย่างปริมาณ 10 มิลลิลิตร จากถังป้อนของวัฏภาคต่อเนื่องทุกๆความเข้มข้นของน้ำหมัก(20, 40, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์(ดูภาคผนวก ก) และความเข้มข้นโปรตีน เพื่อนำไปหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 4.1

$$\text{ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์} = \frac{\text{ค่ากิจกรรมเอนไซม์}}{\text{ความเข้มข้นโปรตีน}} \qquad 4.1$$

จากนั้นนำค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่ได้มาเขียนกราฟเพื่อเปรียบเทียบกันที่ทุกๆความเข้มข้นของน้ำหมัก

4.3.1.2 การหาความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องที่เหมาะสม

เตรียมองค์ประกอบของวัฏภาคต่อเนื่องที่ความเข้มข้นของน้ำหมักในช่วง 20-72 เปอร์เซ็นต์ดังนี้(วิไลวรรณ, 2544)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	8.35	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	19.85	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
น้ำกรอง	0-52	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
น้ำหมัก	20-72	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

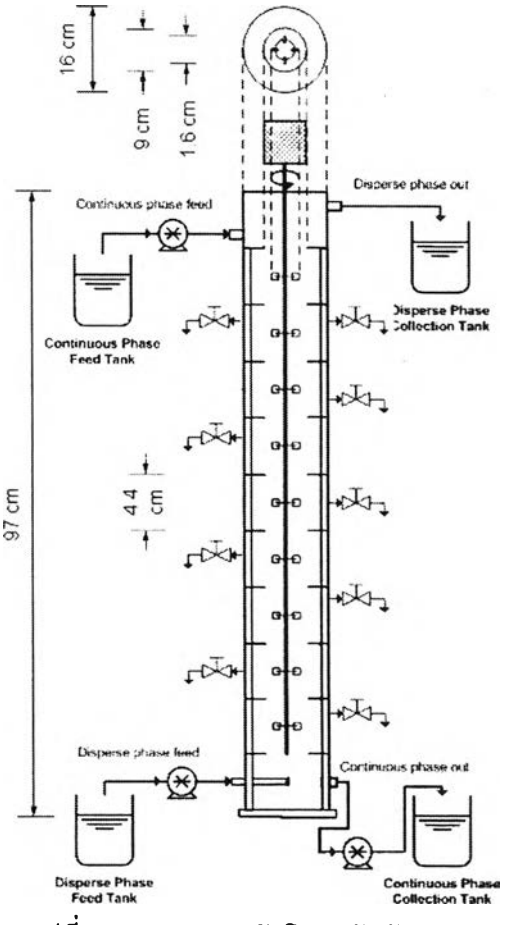
จากนั้นปรับเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.5 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริก 37 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เตรียมองค์ประกอบของวัฏภาคกระจายตัวดังนี้(วิไลวรรณ, 2544)

พอลีเอทิลีนไกลคอล 1000	42.5	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.75	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.75	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
น้ำกรอง	55.00	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

จากนั้นปรับเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.5 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริก 37 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ในการเตรียมวัฏภาคต่อเนื่องเริ่มต้นต้องนำไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมาละลายน้ำให้หมดก่อน จากนั้นจึงค่อยเติมน้ำหมักลงไปและปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ส่วนวัฏภาคกระจายตัวทำโดยนำไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมาละลายน้ำให้หมดก่อน จึงใส่พอลีเอทิลีนไกลคอล 1000 ลงไปแล้วทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง หลังจากเตรียมทั้งสองวัฏภาคเสร็จสิ้น จึงดำเนินการสกัดโดยนำวัฏภาคต่อเนื่องเข้าทางด้านบน วัฏภาคกระจายตัวเข้าทางด้านล่างของหอสกัดดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงหอสกัดโอลชูรัชตันขนาด 5.7 ลิตร

ในการดำเนินการสกัดนั้นจะเก็บตัวอย่างดังนี้ ในถังป้อนของวัฏภาคต่อเนื่อง, ทั้งสองวัฏภาคหลังจากสกัดแล้วที่เวลาต่างๆ และ ตามความสูงของหอสกัดที่ตำแหน่งที่ 0 (ตำแหน่งวัฏภาคต่อเนื่องขาออก), 10, 30, 50, 70 และ 90 (ตำแหน่งวัฏภาคต่อเนื่องขาเข้า) เซนติเมตร เพื่อนำไปหาค่ากิจกรรมเอนไซม์และความเข้มข้นโปรตีน ในการสกัดนั้นจะดำเนินการจนกว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์และความเข้มข้นโปรตีนของทั้งสองวัฏภาคจะมีค่าคงที่ตามเวลา เพื่อนำไปหาโพรไฟล์ความเข้มข้นของเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องตามความสูงของหอสกัด ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมของเอนไซม์ระหว่างวัฏภาค เปอร์เซ็นต์ผลได้ และจำนวนเท่าความบริสุทธิ์

4.3.1.3 การหาอัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวที่เหมาะสมโดยกำหนดสัดส่วนทั้งสองวัฏภาคคงที่ ที่ 3:1

นำความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองในหัวข้อ 4.3.1.2 มาพิจารณาหาอัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวที่เหมาะสมโดยกำหนดให้สัดส่วนทั้งสองวัฏภาคคงที่ ที่ 3:1 โดยเริ่มต้นจากปรับอัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวให้เป็น 42/12, 69/20 และ 97/28 มิลลิลิตรต่อนาทีตามลำดับ จากนั้นจึงดำเนินการสกัดและเก็บตัวอย่างเหมือนในหัวข้อที่ 4.3.1.2 แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์และความเข้มข้นโปรตีน ในการสกัดนั้นจะดำเนินการจนกว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์และความเข้มข้นโปรตีนของแต่ละวัฏภาคจะมีค่าคงที่ตามเวลา เพื่อนำไปหาโพรไฟล์ความเข้มข้นของเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องตามความสูงของหอสกัด ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมของเอนไซม์ระหว่างวัฏภาค เปอร์เซ็นต์ผลได้ และจำนวนเท่าความบริสุทธิ์

4.3.1.4 การหาค่า hold up ของวัฏภาคกระจายตัว

เมื่อปรับเปลี่ยนอัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคของทั้งสองวัฏภาคแล้ว จะทำการวัด hold up ของวัฏภาคกระจายตัวในทุกๆอัตราการไหลเชิงปริมาตร(12, 20 และ 28 มิลลิลิตรต่อนาที) ซึ่งทำได้โดยวัดความสูงจากปลายหอสกัด(0 เซนติเมตร) จนถึง interface ในขณะที่ยังดำเนินการสกัดอยู่และการสกัดนั้นอยู่ในสภาวะคงตัว(steady state)(H_D) และวัดความสูงของวัฏภาคต่อเนื่องหลังจากดำเนินการสกัดเสร็จสิ้นและเกิดการแยกชั้นของแต่ละวัฏภาคอย่างสมบูรณ์(H_C) จากนั้นนำมาคำนวณหาค่า hold up ของวัฏภาคกระจายตัว ดังสมการที่ 4.2 ดังนี้

$$\text{hold up ของวัฏภาคกระจายตัว} = \frac{H_D - H_C}{H_D} \qquad 4.2$$

4.3.1.5 การหาค่า characteristic velocity ($\overline{U_0}$) ที่ความเร็วรอบต่างๆในการปั่นกวน

เตรียมวัฏภาคต่อเนื่องและวัฏภาคกระจายตัวเหมือนในหัวข้อที่ 4.3.1.2 แต่ในวัฏภาคต่อเนื่องนั้นจะใช้น้ำกรองทั้งหมด(72 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) จากนั้นเติมวัฏภาคต่อเนื่องให้เต็มหอสกัด แล้วปล่อยให้วัฏภาคกระจายตัว 1 หยดลอยขึ้นไปในหอสกัดโดยที่มีการปั่นกวนของใบพัดตลอดการทดลอง(100, 140 และ 180 รอบต่อนาที) ทำการจับเวลาที่หยดของวัฏภาคกระจายตัวลอยออกจากรูของ sparger จนถึงยอดหอสกัด(90 เซนติเมตร) เพื่อนำมาคำนวณหาค่า $\overline{U_0}$ ต่อไป

4.3.1.6 การหาการปั่นกวนในหอสกัดที่เหมาะสม

นำอัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคที่เหมาะสมในหัวข้อ 4.3.1.3 มาพิจารณาหาการปั่นกวนในหอสกัดที่เหมาะสม โดยเริ่มต้นจากปรับความเร็วของใบพัดไปที่ 100-200 รอบต่อนาที จากนั้นดำเนินการสกัดและเก็บตัวอย่างเหมือนในหัวข้อที่ 4.3.1.2 แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์และความเข้มข้นโปรตีน ในการสกัดนั้นจะดำเนินการจนกว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์และความเข้มข้นโปรตีนของแต่ละวัฏภาคจะมีค่าคงที่ตามเวลา เพื่อนำไปหาโพรไฟล์ความเข้มข้นของเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องตามความสูงของหอสกัด ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมของเอนไซม์ระหว่างวัฏภาค เปอร์เซ็นต์ผลได้ และจำนวนเท่าความบริสุทธิ์

4.3.2 การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ที่สามารถสกัดได้

นำตัวอย่างที่ได้จากวัฏภาคกระจายตัวที่ผ่านการสกัดออกมาแล้ว มาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดยทดลองวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ทุกๆ 1 สัปดาห์ เป็นจำนวน 4 ครั้ง(เริ่มต้น, 1, 2 และ 3 สัปดาห์) ที่อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส) เพื่อพิจารณาว่าพอลีเอทิลีนไกลคอล 1000 จะสามารถรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ที่ผ่านการสกัดมาแล้วได้หรือไม่

4.4 วิธีการวิเคราะห์

4.4.1 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอส (Raja และคณะ, 1994)

การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ เริ่มต้นโดยการเติมสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH ที่ 10.5 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาณ 0.9 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นใส่สารละลายเอโซเคซีน 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 1

มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วใส่สารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากันอีกครั้งโดยใช้ vortex mixer โดยในการเติมสารที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์จะทำในอ่างน้ำแข็งตลอดเพื่อลดการสูญเสียค่ากิจกรรมเอนไซม์ของสารละลายตัวอย่าง จากนั้นนำหลอดทดลองไปแช่ในอ่างน้ำโดยจะควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และนำขึ้นแช่ในอ่างน้ำแข็งอีกครั้ง แล้วหยุดปฏิกิริยาทันทีด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติก 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหมุนเวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร เพื่อหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็นค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 3 ครั้งต่อหนึ่งตัวอย่าง พบว่าวัฏภาคกระจายตัวมีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างเท่ากับ 9.84 และวัฏภาคต่อเนื่องมีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างเท่ากับ 89.21(มีค่ามากเนื่องในวัฏภาคนี้มีความเข้มข้นเอนไซม์ปริมาณน้อย เมื่อนำมาวิเคราะห์จึงเกิดความคลาดเคลื่อนได้มาก)

ในการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะต้องทำหลอดควบคุม เพื่อเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่ได้จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์อย่างแท้จริง โดยที่การทำหลอดควบคุมนั้นจะใช้สารเคมีปริมาณเท่ากันทั้งหมด ยกเว้นสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH ที่ 10.5 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จะใส่ปริมาณ 1 มิลลิลิตรและจะไม่ใส่สารละลายตัวอย่าง จากนั้นดำเนินการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์เหมือนกันกับสารละลายตัวอย่างข้างต้น โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของหลอดควบคุมจะเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 3 ครั้งต่อหนึ่งตัวอย่าง พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างเท่ากับ 4.20

ดังนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่แท้จริงจึงเกิดจากนำค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุมลบออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากตัวอย่าง จึงจะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่แท้จริง

4.4.2 การเตรียมสารละลายเพื่อหาค่ากิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอส (Raja และคณะ, 1994)

4.4.2.1 สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 0.1 โมลลาร์

ละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 6.05 กรัมลงในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 นอร์มอลหรือกรดไฮโดรคลอริก 2 นอร์มอลจนได้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 10.5 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.4.2.2 สารละลายเอโซเคซีน 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เตรียมเอโซเคซีน 1 กรัม เติมเอทานอล 2 มิลลิลิตร โทลูอีน 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร คนจนเอโซเคซีนละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้ครบ

500 มิลลิลิตร หลังจากนั้นบรรจุในขวดสีชา เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.4.2.3 กรดไตรคลอโรอะซีติก 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เตรียมไตรคลอโรอะซีติก 50 กรัม เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร คนจนละลายทั้งหมด ปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร บรรจุในขวดสีชาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.4.3 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นโปรตีน (Bradford, 1976)

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเริ่มต้นจากการเติมตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตรลงไปในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโคมาเซบิเลี่ยนบูลจี 250 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของโบวีซีรัมอัลบูมิน โดยความเข้มข้นของโปรตีนเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 3 ครั้งต่อหนึ่งตัวอย่าง พบว่าวัฏภาคกระจายตัวมีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างเท่ากับ 33.29 และวัฏภาคต่อเนื่องมีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างเท่ากับ 60.87

การเตรียมกราฟมาตรฐานของโบวีซีรัมอัลบูมิน เริ่มต้นจากการนำโบวีซีรัมอัลบูมินมา 0.01 กรัม ละลายกับน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเตรียมความเข้มข้นของโบวีซีรัมอัลบูมินที่ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการนำสารละลายโบวีซีรัมอัลบูมินที่เตรียมไว้ในตอนแรกมา 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.1, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02 และ 0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจึงจะได้ความเข้มข้นของโบวีซีรัมอัลบูมินตามลำดับ จากนั้นเติมสารละลายโคมาเซบิเลี่ยนบูลจี 250 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยความเข้มข้นของโปรตีนเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 3 ครั้งต่อหนึ่งตัวอย่าง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ได้ไปเขียนเป็นกราฟเพื่อดูค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นของโบวีซีรัมอัล- บูมินต่างๆ (ดูภาคผนวก ข)

4.4.4 การเตรียมสารละลายเพื่อหาปริมาณโปรตีน (Bradford, 1991)

สารละลายโคมาเซบิเลี่ยนบูลจี 250 เกิดจากการนำโคมาเซบิเลี่ยนบลูจี 250 ปริมาณ 0.1 กรัม มาผสมกับเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวมทั้งหมด 1000 มิลลิลิตร ก่อนใช้ควรนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และควรเตรียมสารละลายโคมาเซบิเลี่ยนบลูจี 250 ใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง