บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์การทดลอง

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น G 25 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.,Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psycrotherm incubator shaker) รุ่น AG Rittergasse 27 ของบริษัท INFORS ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirer) รุ่น PC-101 ของบริษัท Corning ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องเขย่าผสม (vortex) รุ่น Vortex-Genie No.2 ของบริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic-21 ของบริษัท Bausch & Lomb ของประเทศสหรัฐอเมริกา

มาตรวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น HI 8424 ของบริษัท Hanna Instruments ประเทศอิตาลี

เครื่องระเหยแห้งภายใต้สูญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) รุ่น RE 52 ของบริษัท Yamato Scientific ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography) รุ่น LC-6A ชุดควบคุมระบบ รุ่น SLC-6A และเครื่องวิเคราะห์ผล รุ่น C-R4A Chromatopac ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องชั่งแบบละเอียด (electronic balance) รุ่น ER-180A ของบริษัท A&D Company ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องชั่งแบบหยาบ (electronic balance) รุ่น Fx-3000 ของบริษัท A&D Company ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องกำเนิดคลื่นอัลตราโซนิก (sonicator) ยี่ห้อ Delta รุ่น Ultrasonic Cleaner D200 ของบริษัท D.S.C. group ประเทศไต้หวัน

ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น IN - 81 ของบริษัท Yamato Scientific ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจน รุ่น Buchi 315 ของบริษัท Laboratoriums-Technik AG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น NK System Clean Bench ของบริษัท International Scientific Supply ประเทศไทย

ตู้อบไมโครเวฟ (microwave) รุ่น MR 6650 ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น

กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CHA ของบริษัท Olympus Optical ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น G25&R25 ของบริษัท New Brunswick Scientific Company ประเทศสหรัฐอเมริกา

แผ่นนับเม็ดเลือดแดง (haemacytometer) รุ่น Neubauer Bright Line ของบริษัท Bacco ประเทศเยอรมันนี

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) Tempunit TU-160 รุ่น FDP 6 D ของบริษัท Techne (Cambridge) Limited ประเทศอังกฤษ

ถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น MD 300 - 5 L L. E. Marubishi,Tokyo ประเทศญี่ปุ่นตัวถังหมักเป็นแก้ว มีใบพัด (impeller) แบบ 6- blade turbine ตัวควบคุมสภาวะเป็น bioprocess controller รุ่น MAIAC-SS เครื่องอัดอากาศ (air compressor) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น และเครื่องควบคุมระบบหล่อเย็น (circular type handy cooler) รุ่น TRL - 180 เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Kagka ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น KT-30SD ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
กรดจิบเบอเรลลิก(GA_3) มาตรฐาน	SIGMA ประเทศสหรัฐอเมริกา
พาราเซทามอล	T.P. DRUG LABORATORIES ประเทศไทย
เอนไซม์ PGO	SIGMA ประเทศสหรัฐอเมริกา
เอนไซม์ อินเวอร์เทส	WAKO PURE CHEMICAL ประเทศญี่ปุ่น
กรดฟอสฟอริก	CARLO ERBA ประเทศอิตาลี
กรดไฮโดรคลอริก	MERCK ประเทศเยอรมัน
กรดซัลฟิวริก	J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดบอริก	CARLO ERBA ประเทศอิตาลี
กรดไดไนโทรซาลิไซลิก	SIGMA ประเทศสหรัฐอเมริกา
คอปเปอร์ซัลเฟต	CARLO ERBA ประเทศอิตาลี
ซิงค์คลอไรด์	CARLO ERBA ประเทศอิตาลี
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK ประเทศเยอรมัน
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรท	FLUKA ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
เมทานอล	J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
เอทานอล	โรงงานสุรา องค์การสุรา กรมสรรพสามิต ประเทศไทย
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK ประเทศเยอรมัน
โซเดียมแอซีเทต	FLUKA ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
ออโท-ไดอะนิซิดีน	SIGMA ประเทศสหรัฐอเมริกา
แอมโมเนียมซัลเฟต	CARLO ERBA ประเทศอิตาลี
แอมโมเนียมไนเตรต	M&B ประเทศสหรัฐอเมริกา
อะลูมิเนียมออกไซด์	MERCK ประเทศเยอรมัน

นอกจากสารเคมีที่ใช้ดังกล่าว ยังมีสารชนิดอื่นอีก เช่น เอทิลแอซีเทต โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Na_2SO_4) และสารอาหารชนิดอื่น เช่น น้ำตาลซูโครส น้ำมันถั่วเหลือง วุ้นผง และมันฝรั่ง ที่ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน จะใช้เป็นเกรดทางการค้า (commercial grade) ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย ส่วนกากถั่วเหลือง

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อราสายพันธุ์กลายของ *G. fujikuroi* ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ โดย ขวัญฤทัย อินสวน (2539)

2.3 วิธีเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เขี่ยเส้นใยของเชื้อ *G. fujikuroi* โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลากลงบนอาหารแข็งเอียง(slant agar) โพเทโทเดกซ์โทรสเสริมแร่ธาตุ (potato dextrose agar,PDA) ภาคผนวก ก 1.1 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

2.4.1 การเตรียมสปอร์

เขี่ยเส้นใยของเชื้อ *G. fujikuroi* ลงบนอาหารแข็งเอียงแอซีเทต (acetate agar slant) ภาคผนวก ก 1.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้หลอดไฟความเข้มแสง 9,840 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ล้างสปอร์ด้วยสารละลายทวีน-80 ร้อยละ 0.1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ไม้ปลายแหลมที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเช่นกัน เขี่ยสปอร์ให้กระจายทั่ว กรองสปอร์แขวนลอยที่ได้ผ่านผ้าสาลู (ประยูรศรี วัฒนโกศล, 2537) นับจำนวนสปอร์แขวนลอยโดยใช้แผ่นนับเม็ดเลือดแดง (haemacytometer)

ในกรณีที่ใช้เชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงเพื่อเตรียมสปอร์จะต้องนำเชื้อไปเลี้ยงในอาหารแข็งโพเทโทเดกซ์โทรสเสริมแร่ธาตุ (potato dextrose agar) ภาคผนวก ก 1.1 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เส้นใยเจริญเต็มที่ก่อนนำมาใช้เตรียมสปอร์ตามวิธีข้างต้น

2.4.2 การเตรียมหัวเชื้อ

นำสปอร์แขวนลอยที่มีปริมาณสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 2.4.1 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อตาม ภาคผนวก ก 1.3 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบวงกลม (rotary incubator shaker) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.5 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

2.5.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในระดับขวดเขย่า

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.4.2 ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิน ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร โดยทำการแปรผันเพื่อหาชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน ฟอสเฟต แมกนีเซียม อะลูมิเนียมออกไซด์ และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น ที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ตามสูตรอาหารที่แสดงในบทภาคผนวก ก นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกวันที่ 7 และ 10 ของการหมัก วัดค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก หาน้ำหนักเซลล์แห้งและวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ตามวิธีการในข้อ 2.6 และนำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว ไปใช้ศึกษาประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ต่อไป

2.5.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามข้อ 2.4.2 ให้ได้ปริมาตรรวม 350 มิลลิลิตร ถ่ายในอาหารเหลวสำหรับผลิต GA_3 ปริมาตร 3,150 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตรากวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที โดยไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างระหว่างตามวิธีของ ศุภชัย สมัปปิโต (2537) และใช้อะดีคานอล (adecanol)เป็นสารต้านการเกิดฟองโดยเตรียม อะดีคานอลต่อน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 3 เก็บตัวอย่างทุกวัน ครั้งละ 20 มิลลิลิตร วัดค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก หาน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดและวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ตามวิธีการในข้อ 2.6

2.6 วิธีการวิเคราะห์

2.6.1 การหาค่าความเป็นกรดด่าง

วัดค่าความเป็นกรดด่างด้วยมาตรวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)

2.6.2 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหมักปริมาตร 25 มิลลิลิตร มากรองผ่านกระดาษกรองวัทแมน เบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ล้างเส้นใยบนกระดาษกรองด้วยน้ำที่ขจัดไอออนแล้ว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำกระดาษกรองที่มีเส้นใยไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ทิ้งไว้ให้เย็นในเดสิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด และหักลบด้วยน้ำหนักของกระดาษกรองและปริมาณถั่วเหลืองเริ่มต้น คำนวณค่าน้ำหนักเซลล์แห้งหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

2.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้กรดไดไนโทรซาลิไซลิก ตามวิธีการของ Bernfeld (Bernfeld, 1955)

เติมสารละลายไดไนโทรซาลิไซลิก (ภาคผนวก ข 1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างที่เจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสมแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นทันที นำไปเติมน้ำที่ขจัดไอออนแล้ว ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้น้ำที่ขจัดไอออนแล้วและผ่านขั้นตอนตามวิธีการข้างต้นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 0.10-1.00 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค 1)

2.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสโดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส (Invertase)

เติมสารละลายอินเวอร์เทสในแอซีเทตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.10 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4 (ภาคผนวก ข 2) ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการข้อ 2.6.3

คำนวณปริมาณน้ำตาลหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0-0.5 กรัมต่อลิตรที่ผ่านขั้นตอนตามวิธีการดังกล่าวข้างต้น(ภาคผนวก ค 2) แล้วนำปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ลบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากข้อ 2.6.3 จะเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากน้ำตาลซูโครสในตัวอย่าง

2.6.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยใช้เอนไซม์ พี.จี.โอ (Huggett and Nixon, 1957)

เติมสารละลายเอนไซม์ พี.จี.โอ (P.G.O enzyme) (ภาคผนวก ข 3) ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ใช้น้ำที่ขจัดไอออนแล้วและผ่านขั้นตอนตามวิธีการข้างต้นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคสหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 0-0.20 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค 3)

2.6.6 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธีของ Kjeldahl

ชั่งของผสมของเกลือ (ภาคผนวก ข 5.1) ปริมาณ 7.0 กรัม ใส่ลงในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยในเตาหลุมด้วยเครื่อง Buchi 425 ในตู้ควันจนได้สารละลายสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำที่ขจัดไอออนแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปกลั่นด้วยเครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจน รองรับสารที่กลั่นออกมาด้วยสารละลายกรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ข 5.3) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งเติมอินดิเคเตอร์ 2 - 3 หยด (ภาคผนวก ข 5.2) กลั่นจนกระทั่งสารละลายกรดบอริกมีปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกจนได้สารละลายสีม่วง และคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน (ภาคผนวก ง 2) โดยที่

ร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ = {(A-B) x N x1.4 }/ ปริมาตรตัวอย่าง

เมื่อ A : ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริก (มิลลิลิตร) ที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง

B : ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริก (มิลลิลิตร) ที่ใช้ในการไทเทรตกับแบลงค์

N : ความเข้มข้น (นอร์มอล) ของกรดไฮโดรคลอริก

2.6.7 การวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิดวิดโครมาโทกราฟี (HPLC) ปรับปรุงจากวิธีการของ อรไท สุขเจริญ (2533)

นำน้ำหมักซึ่งปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 7 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 7 ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันการเกิดอิมัลชัน จากนั้น เติมสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร สารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในที่ใช้คือ ยาพาราเซทามอล (paracetamol) เข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นสกัดด้วยเอทิลแอซีเทตปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียว เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่าผสม นาน 4 นาที ทิ้งให้แยกชั้นแล้วจึงนำชั้นของน้ำหมักมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 3 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 70 ไมโครลิตร จากนั้นสกัดด้วยเอทิลแอซีเทต ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องผสม นาน 4 นาที ทิ้งให้แยกชั้น นำชั้นของเอทธิลแอซีเทตมาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อขจัดน้ำ นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้สูญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำมาละลายด้วยสารละลายเมทานอล เข้มข้นร้อยละ 35 ในสารละลายกรดฟอสฟอริก ค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสแอซีเทตที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกด้วยเครื่อง HPLC คำนวณปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตรโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค 4)

ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีการของอรไท สุขเจริญ (2533)

คอลัมน์	: Spherisorb 5 C8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ยาว 250 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา	: เมทานอลและสารละลายกรดฟอสฟอริก ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3 อัตราส่วน 35 ต่อ 65 คงที่ตลอดการทดลอง
อัตราการไหลของสารละลายตัวพา	: 1 มิลลิลิตรต่อนาที
ตรวจวิเคราะห์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต	: 208 นาโนเมตร
ความไวของเครื่องตรวจวัด	: 0.08 AUFS (absorbance unit full scale)
ปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์	: 10 ไมโครลิตร
ความดัน	: 195-225 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร