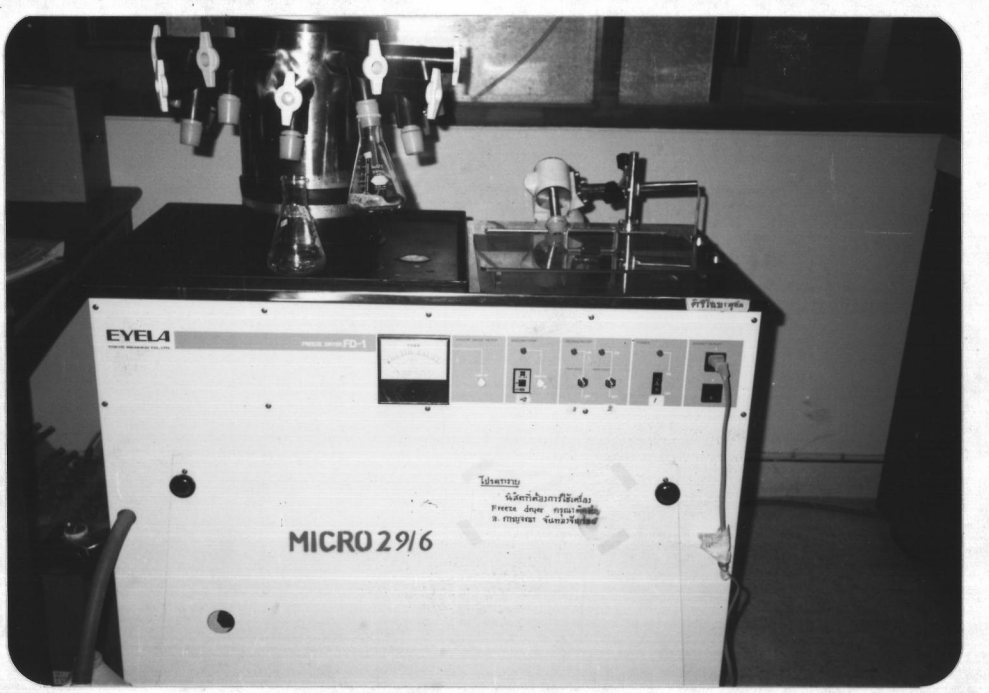
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้การวิจัย

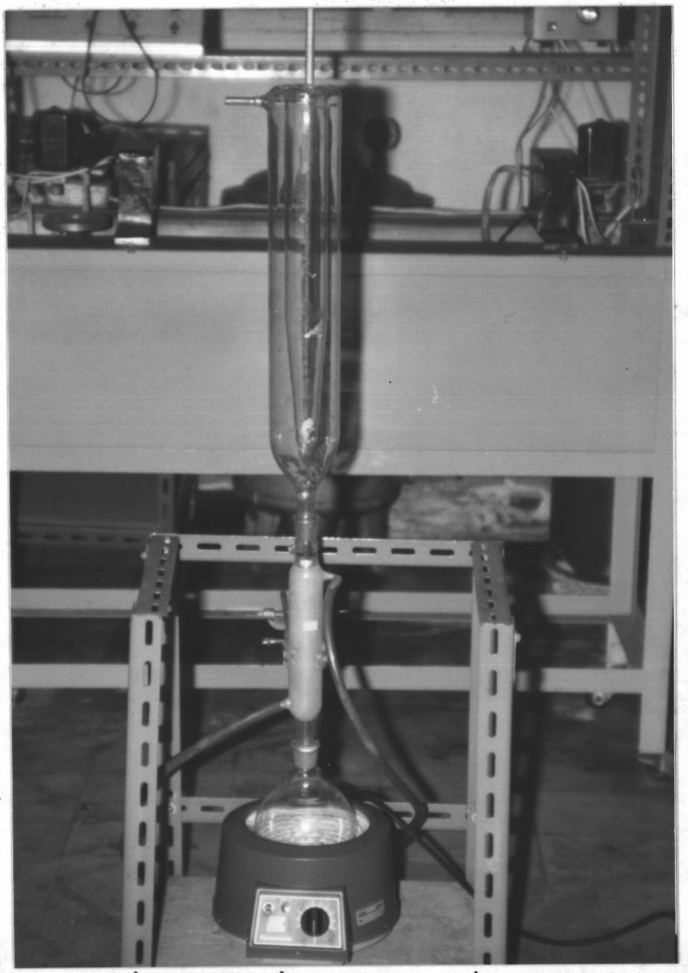
- เครื่องปฏิกรณ์ปรมาณู TRIGA MARK 3 สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ
- เครื่องวัดค่าดูดกลืนลำแสงแบบลำแสงคู่ (Double beam Spectrophotometer)รุ่น 210-5763 บริษัท Hitachi, Japan
- เครื่องวัดพีเอช (PH meter) รุ่น O-70, บริษัท Beckman, USA.
- เครื่องทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง(Freeze dryer)รุ่น FD-1, บริษัท Eyela,Japan ดังรูปที่ 3.1
- เครื่องระเหิดสาร ดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.1 เครื่องทาให้แห้งแบบเยือกแข็ง

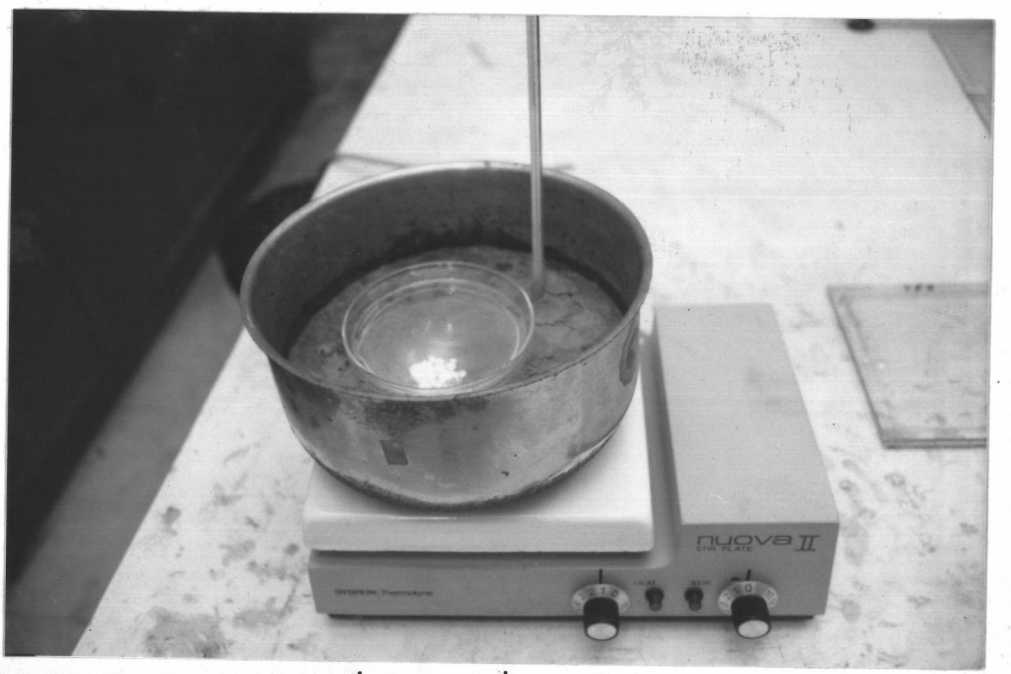
- เครื่องสกัดแบบต่อเนื่อง ดังรูปที่ 3.3

i17964961



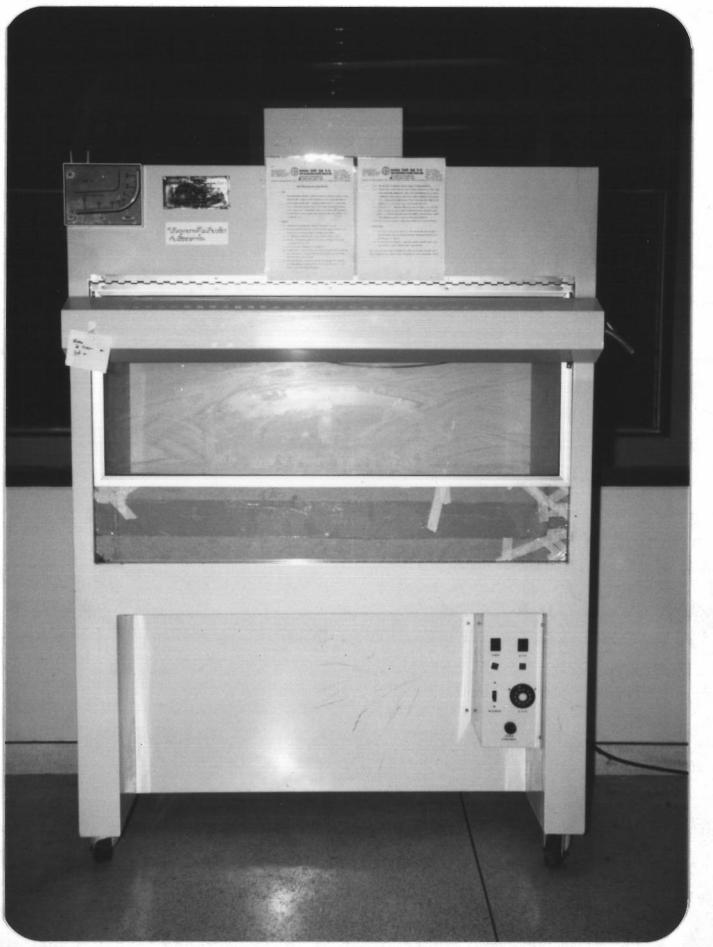
รูปที่ 3.3 เครื่องสกัดแบบต่อเนื่อง

- เครื่องบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน(Homogenizer) ,ยี่ห้อ Ace Homoginizer, บริษัท Nihonseiki Kaisha.LTD. , Japan.
- เครื่อง Rotary Vacuum Evaporator ,ยี่ห้อ Tokyo, Kikakikai co, Ltd. , Japan
- เครื่องอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์, รุ่น IR-440, ยี่ห้อ Shimdzu, Japan
- เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ รุ่น FX90Q ยี่ห้อ JETRO, Japan
- เครื่องอัลตราไวโอเลตสเปกโทรมิเตอร์ , รุ่น UV-240 ยี่ห้อ Shimadzu, Japan
- เครื่องวัดลิดควิดซินทิลชัน, รุ่น TRI-CARB 1050 บริษัท Packard, USA.



รูปที่ 3.2 เครื่องระเหิดสาร

- เครื่องวัดลิควิดซินทิลเลชัน(Liquild Scintillation Counter หรือ LSC)
- เครื่องลามินาร์โฟล (Laminarflow) รุ่น BV-124, บริษัท International Scientific Supply, Bangkok. ดังรูปที่ 3.4
- หม้อนึ่งอัดไอดัน (Autoclave), รุ่น HA-3D ,บริษัท Hirayama Manufacturing Co., Tokyo, Japan
- Vortex Genic, รุ่น K-550 GE., Sciencific INC., N.Y. ,USA.
- เครื่องบด Blender, รุ่น Solid State Culture, National Co., Ltd.
- โรงงานฉายรังสีแกมมา ,สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ
- เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ,ยี่ห้อ Shimadzu, รุ่น 7AG,Japan
- เครื่องชั่งน้ำหนัก ,ยี่ห้อ Sartorius รุ่น L2220P, Germany
- เครื่องชั่งน้ำหนัก,รุ่น S-2000, MeHler, Switzerland
- ตู้อบแห้ง ,ยี่ห้อ Memert ,รุ่น UL 60, Germany



รูปที่ 3.4 เครื่องลามินาร์โฟล

3.2 รายชื่อสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ชื่อสารเคมี	บริษัทที่ผลิต
$NH_4 NO_3$	Merck
KNO_3	M&B
$CaCl_2 2H_2O$	Merck
$MgSO_4 7H_2O$	M&B
Na_2 EDTA	Sigma

ชื่อสารเคมี	บริษัทที่ผลิต
$FeSO_4$ $7H_2O$	BDH
KH_2PO_4	Carlo Erba
$MnSO_4$ $4H_2O$	M&B
$ZnSO_4.4H_2O$	Riedel-DeHaeny
H_3BO_3	Riedel-DeHaeny
KI	Carlo Erba
$Na_2MoO_4.2H_2O$	M&B
$CuSO_4$ $5H_2O$	M&B
$CoCl_2$. $6H_2O$	M&B
Glycine	Sigma
nicotinic acid	BDH
pyridoxine.HCl	Sigma
thiamine.HCl	Sigma
kinetin	Fluka
myo-inositol	Merck
IAA	Carlo Erba
น้ำตาลทรายขาว	MITRPROL
วุ้นผง	
NaOH	EKA
NH_4OH	BDH
nicotinamide	Merck

ชื่อสารเคมี	บริษัทที่ผลิต
นิโคติน	Fluka
Absolute Ethanol	Merck
Diethyl ether	Merck
Ethanol 95%	โรงงานสุราบางยี่ขัน
Methanol	Merck
Al_2O_3	Merck
Diazomethane	Sigma
HCl	BDH
Chloroform	M&B
NAA	Carlo Erba
Activated Charcoal	
Benzene	Merck
PPO	Merck
POPOP	Nuclear Enterprises Limited
Tetrahydrofuran	Carlo Erba
$Li_2 CO_3$	
H_2O_2 35% v/v	Merck
Liguild Nitrogen	
Tween 80	Sigma
Casine	Sigma
KOH	KPE

ชื่อสารเคมี	บริษัทที่ผลิต
CH_3 COOH	Merck
Bezamide	BDH
Tritiated water.	
สารกัมตภาพรังสีมาตรฐาน H-3,C-14	Amersham International Co, UK.

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัยดังต่อไปนี้

3.3.1 การศึกษาการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณกรดนิโคตินิก และนิโคติน คือ การสร้างกราฟมาตรฐานได้จากการวัดเปรียบเทียบโดยนำสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอนมาวัดด้วยเครื่องวัด และผลที่ได้จากปริมาณสารมาตรฐานและค่าที่ได้จากเครื่องวัดจะนำมาสร้างกราฟมาตรฐานประโยชน์ที่ได้คือเป็นตัวเปรียบเทียบว่าสารนั้น มีปริมาณสารมาตรฐานอยู่ในเนื้อสารนั้นเท่าใดแบ่งเป็น

3.3.1.1 การสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกรดนิโคตินิกกับค่าดูดกลืนแสงดังนี้

3.3.1.1.1 นำนิโคตินิกปริมาณเล็กน้อยมาละลายในน้ำให้เจือจางและทำการวัดหาความยาวช่วงคลื่นของสารจากยอด(peak) ของอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี(UV. Spectroscopy)จากเครื่องวัดอัลตราไวโอเลตสเปกโตรมิเตอร์ (UV.Spectrometer)(23) ดังรูปที่ 3.5

รูปที่ 3.5 เครื่องวัดอัลตราไวโอเลตสเปกโตรมิเตอร์

3.3.1.1.2 เมื่อได้ความยาวช่วงคลื่นแสงที่ถูกดูดกลืนแสงสูงสุดของสาร นำกรดนิโคตินิก 20,40,60,80 และ100 มิลลิกรัมนำมาละลายในน้ำตัวอย่างละ 10 ซีซี และทุกตัวอย่างทำให้เจือจาง 1000 เท่า และนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดอัลตราไวโอเลตสเปกโตรมิเตอร์

3.3.1.1.3 สร้างกราฟระหว่างปริมาณกรดนิโคตินิกกับค่าดูด

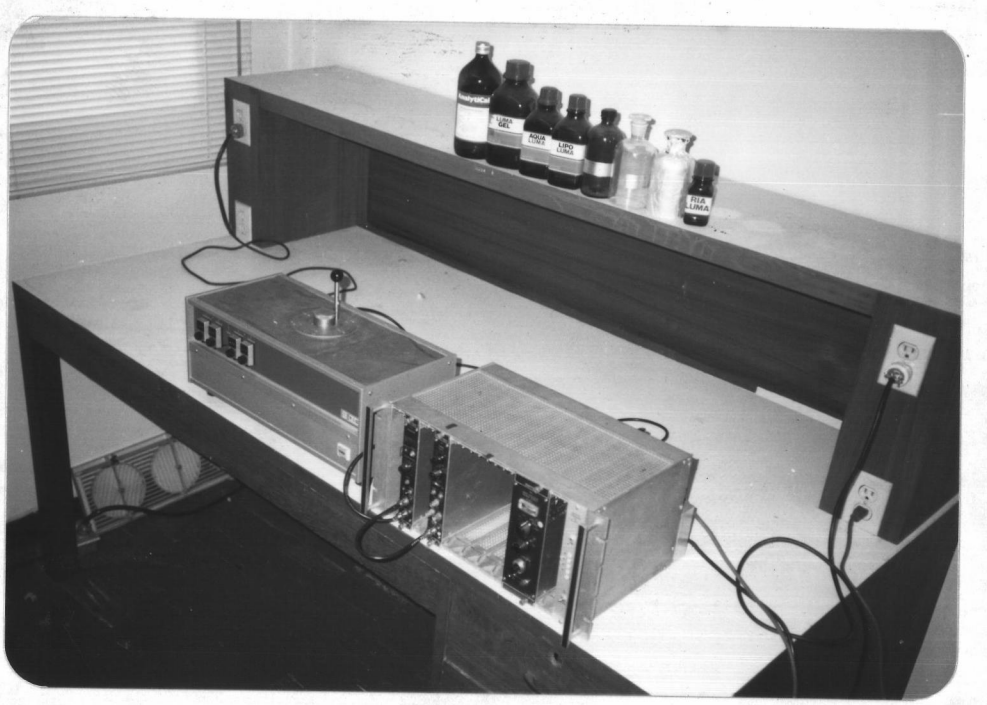
3.3.1.2 การสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณนิโคติน กับค่าดูดกลืนแสง

3.3.1.2.1 นานิโคตินปริมาณเล็กน้อยมาละลายในน้ำให้เจือจางและทำการวัดหาความยาวช่วงคลื่นแสงของสารจากยอด(peak)ของอัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี (UV. Spectroscopy)

3.3.1.2.2 นำนิโคติน 1,2, 4,6,8 และ 10 ซีซี ตามลำดับ และนำทุกตัวอย่างทำให้เป็นเจือจาง 100000 เท่าและนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดอัลตราไวโอเลตสเปกโตรมิเตอร์

3.3.1.2.3 สร้างกราฟระหว่างปริมาณนิโคตินกับค่าดูดกลืนแสง

3.3.2 การศึกษาการวัดกัมมันตภาพรังสี เมื่อทำการวัดกัมมันตภาพรังสีจำเป็นต้องมีอุปกรณ์วัดรังสีเพื่อตรวจสอบปริมาณรังสีว่ามีความแรงรังสีเท่าใด แต่การทดลองนี้เป็นการนับวัดต้นกำเนิดรังสีเบต้าที่มีความแรงรังสีระดับต่ำ ได้แก่ คาร์บอน 14 และทริเทียมนำไปติดฉลาก (label) กับสารประกอบอินทรีย์เคมีจำเป็นต้องใช้เครื่องวัดรังสีระดับต่ำเครื่องวัดลิควิดซินทิลเลชัน(LSC) ดูได้ในภาคผนวก ก ดังรูปที่ 3.6 ในการวัดรังสีที่ดี จะวัดโดยปรับศักดาไฟฟ้าแรงสูงที่ไม่มีผลต่ออัตราความเปลี่ยนแปลงต่อไฟฟ้า และสูงน้อยที่สุดนั่นคือบริเวณพลาโทดังนี้



รูปที่ 3.6 เครื่องวัดรังสีเบตาระดับต่ำแบบลิดควิดซินทิลชัน(LSC)

3.3.2.1 การศึกษาหาไฟฟ้าแรงสูงเหมาะที่สุด(Optimum High Voltage) และเปอร์เซนต์ประสิทธิภาพ(% Effiency) ในการวัด

3.3.2.1.1 ให้ตั้งขีดเริ่มเปลี่ยน(threshold)ที่ 240 โวล์ต เพื่อขจัดความแรงรังสีจากสภาวะแวดล้อม(Background) และตั้งหน้าต่าง(window) ที่ 1000 โวล์ต

3.3.2.1.2 ใส่สารกัมมันตรังสีมาตรฐานเบตาคาร์บอน 14 ตั้งอัตราการขยาย(gain)ที่ 1 ตั้งไฟฟ้าแรงสูงที่ 0 โวล์ต จากนั้นอุ่นเครื่องและหัววัดประมาณ 15-20 นาที เพื่อให้เครื่องและหัววัดพร้อมที่จะทำงาน และให้แสงที่ไปทำปฏิกิริยากับตัวเปล่งแสง(scintillator)นั้นสลาย(decay)ลง

3.3.2.1.3 ตั้งไฟฟ้าแรงสูงที่ 700 โวลต์ทำการนับครั้งละ 1 นาที 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยและเพิ่มขึ้นครั้งละ 100 โวลต์ถึง 1500 โวลต์ ให้ทำการบันทึก หรือ อาจหยุดการทดลองเมื่อค่านับมีค่าลดลงจากค่าสูงสุดประมาณ 2 ถึง 3 ค่า

3.3.2.1.4 เปลี่ยนสารกัมมันตรังสีเป็นทริเทียม ตั้งอัตราการขยาย(gain) 10 และขีดเริ่มเปลี่ยนที่ 425 โวล์ต และหน้าต่าง 1000 โวล์ต ทำการนับวัดโดยตั้งไฟฟ้าแรงสูงที่ 1000 ถึง 1900 โวลต์ ทำการนับวัดครั้งละ 1 นาที 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยให้ทำการบันทึกหรืออาจหยุดการทดลองเมื่อค่านับมีค่าลดลงจากค่าสูงสุดประมาณ 2 ถึง 3 ค่า

3.3.2.1.5 สร้างเส้นกราฟพลาโท(plataue curve) และหาตำแหน่งไฟฟ้าแรงสูงเหมาะที่สุด รวมทั้งหาประสิทธิภาพของหัววัดรังสีของสารกัมมันตรังสีทริเทียม และ คาร์บอน 14 แต่ในการวัดกัมมันตภาพรังสีจากทริเทียม และคาร์บอน 14 ที่ติดฉลากกับสารประกอบอินทรีย์ โดยจะนำสารประกอบอินทรีย์กัมมันตรังสี ปริมาณน้อยที่สุดที่ทำได้มาละลายในเตทตราไฮโดรฟูราน(ซึ่งทำหน้าที่ให้สารอินทรีย์รวมตัวกับสารอินทรีย์ได้) ให้ละลายจน

หมดเป็นเนื้อเดียวกันและเติมสารละลายคอกเทล(Cocktail) 12-15 ซีซี. โดยมีส่วนผสมคือ PPO 20 กรัม และ POPOP 0.5 กรัม ละลายในเบนซีน 1 ลิตร จะได้ส่วนผสมรวมนี้คือ ตัวเปล่งแสง(Scintillator) และทำการวัดกัมมันภาพตรังสี ณ ไฟฟ้าแรงสูงเหมาะที่สุดของสารกัมมันตรังสีนั้นๆ

3.3.3 การศึกษาการแก้ปัญหาความผิดพลาดในระบบนับวัดของลิคควิดซินทิลเลชัน เมื่อจัดระบบการนับวัดรังสี คือ อัตราส่วนของตัวเปล่งแสงคือ คอกเทล(Cocktail) กับ เตทตราไฮโดรฟูราน คือ 12 มิลลิลิตร ต่อ 8 มิลลิลิตรตามลำดับ แต่ถ้าสารอินทรีย์ละลายในเตทตราไฮโดรฟูรานได้ดีจะใช้อัตราส่วน 15 มิลลิลิตร ต่อ 5 มิลลิตร ตามลำดับ และเพื่อแก้ปัญหาการเควนชิง(quenching) จะใช้น้ำที่ติดฉลากทริเทียม 10 ไมโครลิตร ละลายในส่วนผสมของตัวเปล่งแสง และทำการนับวัดด้วยลิคควิดซินทิลเลชัน(LSC) จากนั้นทำการหาประสิทธิภาพระบบนับวัด จากสมการที่ 1

$$\text{ประสิทธิภาพการนับวัด} = \frac{\text{CPS x 100}}{\text{DPS}} \qquad (1)$$

เมื่อ CPS คือ ค่าอัตรานับที่ได้จากลิคควิดซินทิลเลชั่น(LSC)ได้จากสมการที่ 2

$$A_t = A_0 e^{-\lambda t} \qquad (2)$$

โดย A_0 = กัมมันตภาพรังสีของน้ำที่ติดฉลากทริเทียม

$\lambda = \frac{0.693}{\text{ค่าครึ่งชีวิตของไอโซโทปนั้น}}$

t = ช่วงเวลาที่ไอโซโทปถูกผลิตขึ้นจนถึงเวลาที่ทำการนับวัด

DPS คือ ความเข้มกัมมันตภาพรังสีแท้จริง ณ เวลาที่นับวัด

3.3.4 การศึกษาการสังเคราะห์กรดนิโคตินิกกัมมันตรังสี โดยก่อนการสังเคราะห์

กรดนิโคตินิกกัมมันตรังสีต้องศึกษาขั้นตอนการสังเคราะห์ให้ละเอียดก่อน และทดลองสังเคราะห์เลียนแบบก่อน คือ สารชนิดเดียวกันติดฉลาก(label)ด้วยสารกัมมันตรังสี แต่ในการสังเคราะห์กับสารกัมมันตรังสีจะต้องระมัดระวังอย่างสูง เนื่องจากอันตรายจากกัมมันตภาพรังสี ในการทดลองการสังเคราะห์กรดนิโคตินิกนี้ใช้ 2 วิธี คือ

3.3.4.1 การศึกษาการสังเคราะห์กรดนิโคตินิก C-14

3.3.4.1.1 นำนิโคตินามีดน้ำหนัก 5 กรัม เทใส่หลอดแก้วควอซท์ แล้วปิดผนึกโดยใช้เปลวไฟ นำไปอาบรังสีนิวตรอน ในเครื่องปฏิกรณ์นิวเคลียร์ ของสำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ(อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส)เป็นเวลานาน 228 ชั่วโมง ณ ตำแหน่ง Rotary Specimen rack(up position) ซึ่งความเข้มข้นนิวตรอน 0.7 $x10^{12}$ นิวตรอน/ตารางเซนติเมตร/วินาที มี Cd ratio 9.6 (24)

3.3.4.1.2 นำหลอดแก้วควอซท์มาเปิดผนึก ชั่งได้นิโคตินามีดคาร์บอน 14 บันทึกน้ำหนัก

3.3.4.1.3 นำสารนิโคตินามีดคาร์บอน 14 มาละลายในแอลกอฮอล์เดือดแล้วใส่ถ่านกัมมันต์(activated charcoal) ซึ่งผ่านการบดละเอียดและอบแห้งปริมาณ 2% ของน้ำหนักอามีด จากนั้นกรองสารละลายอามีดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

3.3.4.1.4 นำสารละลายอามีดที่ผ่านการกรองเติมเบนซามีด(Benzamide) ซึ่งเป็นตัวพาหะ(carrier) ในอัตราส่วนระหว่างนิโคตินามีดต่อเบนซามีด คือ 1 ต่อ 1 จากนั้นลดปริมาตรของสารละลายจนได้สารผสมอามีด ชั่งน้ำหนักและวัดกัมมันตภาพรังสีด้วยเครื่องวัดลิควิดซินทิลชัน(LSC)

3.3.4.1.5 นำสารผสมอามีดมาไฮโดรไลซ์(hydrolyze) ด้วยการรีฟลักซ์(reflux) กับสารละลาย 10% NaOH ปริมาตร 15 เท่าของน้ำหนักสารผสมอามีดเป็นเวลานาน 2 ถึง 3 ชม. แล้วตรวจสอบถ้าสารละลายอยู่ในรูปด่างแสดงว่านิโคตินามีด

กลายเป็นกรดนิโคตินิก

3.3.4.1.6 นำสารละลายด่างมาปรับพีเอชน้อยกว่า 1 แล้วสกัดสารละลายด้วยอีเทอร์เพื่อเอากรดเบนโซอิก(benzonic acid)ออก โดยใช้กรวยแยก (Separatory funnel)

3.3.4.1.7 นำสารละลายกรดมาปรับพีเอช 3 แล้วสกัดสารละลายกรดด้วยอีเทอร์เพื่อเอานิโคตินามีดออกโดยใช้กรวยแยก

3.3.4.1.8 ทำการตกผลึกในน้ำและแอลกอฮอล์แล้ววัดกัมมันตภาพรังสี ด้วยเครื่องวัดลิควิดซินทิลเลชัน(LSC)

3.3.4.1.9 นำสารผสมกรดมาทำปฏิกริยาเอสเทอร์กับไดอะโซมีเทน(diazomethane) ปริมาณมากพอจะอยู่ในรูปสารผสมแขวนลอยในอีเทอร์ จากนั้นกำจัดเอาอีเทอร์ออก ด้วยเครื่องอังไอน้ำ(water bath) อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียสจะได้สารลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลือง

3.3.4.1.10 นำสารในรูปน้ำมันมารีฟลักซ์ด้วยสารละลาย NH_4OH เข้มข้น เป็นเวลา 2 ชั่วโมงจากนั้นลดปริมาตรลงให้เหลือปริมาตรน้อยที่สุด แต่ไม่ถึงตกตะกอน

3.3.4.1.11 นำสารละลายที่ลดปริมาตรมารีฟลักซ์ด้วย 4 N NaOH ปริมาตร 150 ซีซี. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาสกัดด้วยอีเทอร์โดยอาศัยเครื่องสกัดแบบต่อเนื่องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูรูปที่ 3.3

3.3.4.1.12 นำสารละลายในข้อ 12 มาปรับพีเอช 3 แล้วทำการสกัดด้วยอีเทอร์ด้วยเครื่องสกัดแบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

3.3.4.1.13 ทำการตกผลึกด้วยน้ำและแอลกอฮอล์

3.3.4.1.14 นำสารประกอบมาระเหิดที่อุณหภูมิที่ 180-240

องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 3.3

3.3.4.1.15 นำผลึกที่ได้จากกระเทิดมาตกผลึกในน้ำและนำไปละลายแอลกอฮอล์ร้อนกับด่างทับทิม 0.19 กรัม กรองและตกผลึกในแอลกอฮอล์ และทำการหาปริมาณน้ำหนักรวมทั้งพิสูจน์ว่าเป็นกรดนิโคตินิกจากอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี(IR) และเอ็นเอ็มอาร์(NMR) หรือนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ และหาความบริสุทธิ์ด้วยอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปีและทำการวัดกัมมันตภาพรังสีเบต้าพลังงานต่ำด้วยเครื่องวัดลิควิดซินทิลเลชัน (LSC) รวมถึงการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารกัมตภาพรังสีที่ให้รังสีเบต้า นอกจากนี้ยังต้องตรวจสอบการปนเปื้อนของผลผลิตข้างเคียงที่ให้รังสีแกมมาด้วยหัววัด High Purity Germanium(HPGe)

3.3.4.2 การศึกษาการสังเคราะห์กรดนิโคตินิก H-3

3.3.4.2.1 ผสมกรดนิโคตินิกกับลิเทียมคาร์บอรเนต (Li_2CO_3)ในอัตราส่วน 20.1 กรัม กับ 1.11 กรัม ตามลำดับนำมาบดให้ละเอียดและผสมให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวกัน

3.3.4..2.2 นำสารเทลงในหลอดแก้วควอซท์ แล้วปิดผนึกโดยใช้เปลวไฟนำไปอาบรังสีนิวตรอนในเครื่องปฏิกรณ์นิวเคลียร์ ณ สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติเป็นเวลานาน 12, 24 และ 36 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มรังสี $0.7x10^{12}$ นิวตรอน/เซนติเมตร^2/วินาที มี Cd ratio = 9.6 (24)

3.3.4.2.3 เปิดผนึกหลอดแก้วควอทซ์ที่ผ่านการอาบรังสีโดยจะต้องแช่ในไนโตรเจนเหลว(Liquild Nitrogen)นาน 1 ชั่วโมงก่อนเปิดผนึก เพื่อกันการระเบิดเมื่อเปิดผนึกนำสารสีน้ำตาลมาทำการระเหิดที่ 180-240 องศาเซลเซียส และละลายในแอลกอฮอล์เพื่อแยกเอา Li_2CO_3 ออกและเติมด่างทับทิม ในสายละลายแอลกอฮอล์ร้อน และกรอง

3.3.4.2.4 ตกผลึกในแอลกอฮอล์และน้ำตามลำดับหาความบริสุทธิ์จากอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี และวัดกัมมันตภาพรังสีเบตาพลังงานต่ำด้วยเครื่องวัดลิควิดซินทิลชัน(LSC) รวมถึงการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารกัมมันตรังสีที่ให้รังสีเบตา นอกจากนี้ยังต้องตรวจสอบการปนเปื้อนของผลผลิตข้างเคียงที่ให้รังสีแกมมาด้วยหัววัด HPGe

3.3.4.2.5 แต่เพื่อที่จะให้ได้กรดนิโคตินิกทริเทียมมีความบริสุทธิ์สูง จึงนำกรดนิโคตินิกทริเทียมมาสกัดด้วยอีเทอร์ ณ พีเอชน้อยกว่า 1 และทำการสกัดซ้ำด้วยอีเทอร์ ที่ พีเอช 3

3.3.4.2.6 ทำการตกผลึกด้วยแอลกอฮอล์ แล้วทำการระเหิดในช่วงอุณหภูมิ 180-240 องศาเซลเซียส

3.3.4.2.7 ทำการตกผลึกด้วยแอลกอฮอล์ และน้ำ

3.3.4.2.8 ทำการวัดความบริสุทธิ์กรดนิโคตินิกด้วยอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปีและวัดกัมมันตภาพรังสี ด้วยเครื่องวัดลิควิดซินทิลชัน(LSC) รวมถึงการตรวจสอบการปนเปื้อนของผลผลิตข้างเคียงที่ให้รังสีแกมมา

3.3.4.2.9 เพื่อกำจัด $^{3}H^{+}$ ที่เคลื่อนย้ายออกไปได้ (labile) จะใช้อุปกรณ์กลั่นดังรูปที่ 3.7 โดยให้อัตราการระเหยของน้ำจากขวดกลั่นที่บรรจุกรดนิโคตินิกกัมมันตรังสีที่ตกผลึกในน้ำ เท่ากับอัตราการน้ำเข้าจากบิวเรตต์สู่ขวดกลั่น ในการกำจัด $^{3}H^{+}$ ได้ หรือไม่ โดยตรวจสอบ $^{3}H^{+}$ จากหลอดรองรับที่มีน้ำกลั่นกัมมันตรังสีในที่เก็บลำดับส่วน ซึ่งเก็บลำดับส่วนทุกๆ 2 ซีซี นำแต่ละลำดับ ส่วนตรวจสอบว่ามี $^{3}H^{+}$ หรือไม่มีรังสีถ้าไม่แสดงว่าตำแหน่งที่เคลื่อนย้ายถูกกำจัดไปแล้ว

รูปที่ 3.7 เครื่องกลั่นไอน้ำที่กำจัด $^{3}H^{+}$ ที่ตำแหน่งที่เคลื่อนย้าย

3.3.5 การศึกษาการเพาะเลี้ยงคัลลัสเพื่อสังเคราะห์นิโคติน และนิโคตินกัมมันตรังสี มีจุดประสงค์ก็การศึกษาดูว่าการเจริญเติบโตของคัลลัส(cullus) มีลักษณะแบบใด ทั้งรูปร่าง, สี, ขนาด และน้ำหนักในแต่ละสัปดาห์รวมทั้งปริมาณนิโคตินที่สะสมในคัลลัส (25) ทุก ๆ 2 สัปดาห์โดยใช้ทฤษฎีว่านิโคตินิกสามารถเปลี่ยนเป็นนิโคตินโดยอาศัยเนื้อเยื่อได้

3.3.5.1 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคัลลัสนิโคติอะนาทาแบคคุมแบบไม่มีอวัยวะ

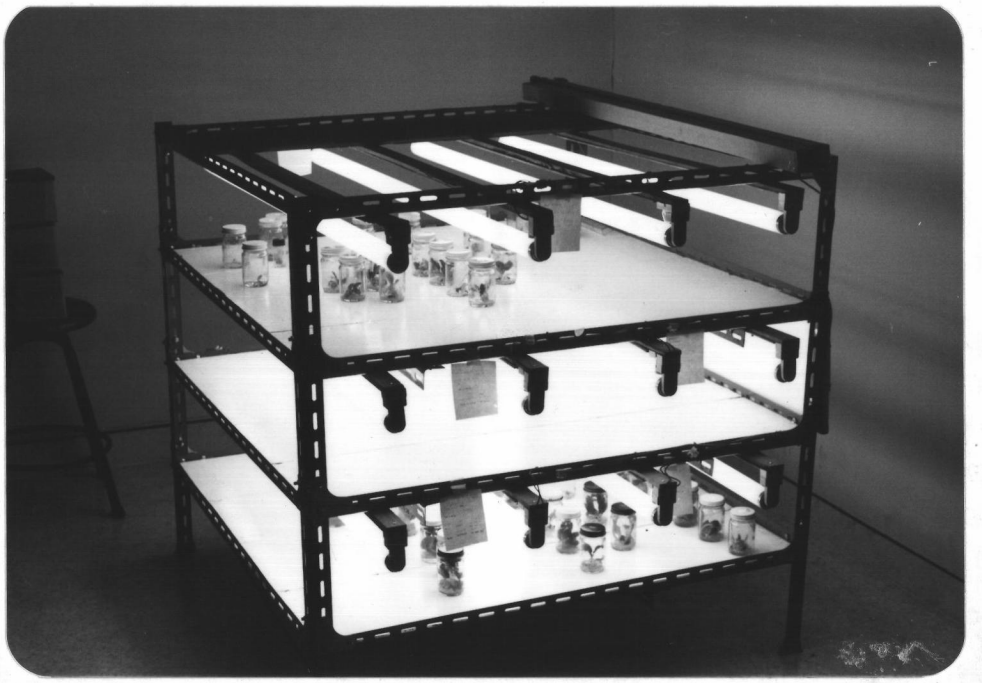
3..3.5.1.1 นำ H_2O_2 30-45% 100 ซีซี. เทลงในขวดชมภู่ที่มีทวีน(Tween) 80 ซึ่งผ่านการทำให้ไร้เชื้อ 1 ซีซี.(ทวีน 80 ทำหน้าที่คล้ายผงซักฟอกเพื่อตรวจสอบว่าล้างเอา H_2O_2 ออกหมดหรือไม่ ถ้าล้างออกหมด H_2O_2 จะออกหมดด้วย) และนำเมล็ดต้นใบยาสูบกลุ่มนิโคติอะนาทาแบคคุม(Nicotiana tabacum) พันธุ์เบียวใหญ่ 14

หรือ เคนทักกี้ 14 หรือ KY-14 (ดูได้จากภาคผนวก ข)จากอำเภอนางรองจังหวัดเพชรบูรณ์ 100 มิลลิกรัม แช่ในน้ำยาทวีน 80 กับ H_2O_2 2 นาที จากกรองเอาเมล็ดเก็บไว้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (25)

3.3.5.1.2 ล้างเมล็ดใบยาสูบด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 500 ซีซี. 3 ครั้ง โดยใช้เครื่องดูดอากาศ เทเมล็ดลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำ 100 ซีซี.ซึ่งผ่านการทำให้ไร้เชื้อ (16)

3.3.5.1.3 ใช้หลอดแก้วกรองเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ปลอดเชื้อ โดยดูดเอาเมล็ดยาสูบที่ไร้เชื้อวางบนกระดาษกรอง 2 ชั้น ซึ่งเปียกน้ำ 4 ซีซี. ในขวดชมภู่(flask) 250 ซีซี. จากนั้นนำไปเพาะในมืดเป็นเวลา 7 วัน ณ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 30-40% (16)

3.3.5.1.4 เมื่อเมล็ดมีการงอก(germination) โดยมีทั้งราก และใบเลี้ยงคู่สีเหลือง นำมาให้แสงสว่างจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนซ์ 4.125-4.4 กิโลลักซ์ ดังรูปที่ 3.8 เป็นเวลา 7 วัน ณ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 30-40% โดยแสงสว่างที่พืชได้รับ 16 ชั่วโมงต่อวัน (27) เพื่อให้ต้นพืชได้สังเคราะห์แสงทำให้ใบเลี้ยงคู่ของยาสูบจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเขียว และจะได้ต้นกล้าสูงขนาด 2-3 เซนติเมตร



รูปที่ 3.8 ชั้นวางที่ให้แสงสว่างแก่ต้นใบยาสูบ

3.3.5.1.5 นำต้นกล้ามาเพาะลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ M&S 10 IAA, 0.1K(ดูได้ในภาคผนวก ค และ ง) 10 ซีซี ต่อขวดโดยเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทุกๆ 3 สัปดาห์เป็น เวลานาน 2 เดือน จะได้ต้นยาสูบสูง 7-10 เซนติเมตร (28,29) จากนั้นจะตัดลำต้นทำให้เป็นคัลลัส โดยนำต้นใบยาสูบความสูง 7-10 เซนติเมตร มาตัดโดยตัดให้เหนือจากราก 2 เซนติเมตร และตัดต่ำกว่ายอด 3 เซนติเมตร ตัดให้ได้ความยาว 1 ซม. ด้วยมีดผ่าตัดเบอร์ 7 ที่ผ่านการทำให้ไร้เชื้อ แล้วนำลำต้นขนาดสูง 1 เซนติเมตรวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ M&S 11.5μM NAA และ 1μM ไคนิติน(ดูในภาคผนวก ค และง) (18)

3.3.5.1.6 ทำการเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดเป็นคัลลัสนาน 1 เดือน ทำการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทุกๆ 2 สัปดาห์ ในที่มืด ณ อุณหภูมิ 25$\pm$2

องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 30-40% และคัดเลือกคัลลัสที่มีลักษณะร่วนสีเขียวแกมขาว จากวิธีการของ Pinol และคณะ (18)

3.3.5.1.7 แต่ในการทดลองของ Pinol และคณะ (18) ใช้คัลลัสที่มีน้ำหนักแห้ง 30+1 มิลลิกรัม ในการวิจัยสังเคราะห์นิโคติน แต่ในการวิจัยนี้ จะใช้คัลลัสที่วัดในรูปน้ำหนักสด ดังนั้นจึงต้องทราบความสัมพันธ์ระหว่างคัลลัสที่วัดในรูปน้ำหนักสด กับคัลลัสที่วัดในรูปน้ำหนักแห้ง ดังนั้นจึงต้องทำการทดลองโดยตัดคัลลัส 0.25 กรัม ถึง 1.25 กรัม โดยเพิ่มน้ำหนักสดขึ้นขั้นละ 0.25 กรัม ตัดทั้งหมด 3 ครั้ง นำไปอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วหาความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ระหว่างคัลลัสที่วัดในรูปน้ำหนักสด กับคัลลัสที่วัดในรูปน้ำหนักแห้ง (18)

3.3.5.1.8 นำคัลลัสสีเขียวแกมขาวลักษณะร่วนมาตัดเป็นก้อนให้มีน้ำหนักแห้งตั้งแต่ 30+1 มิลลิกรัม แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ M&S 1μM ไคนิติน และ 1μM NAA (ดูในภาคผนวก ค และ ง) นาน 6 สัปดาห์ ณ อุณหภูมิ 25$\pm$2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 30-40% โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด โดยให้ชุดแรกเพาะเลี้ยง ในที่มืดแต่เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 10 ซีซี.ทุกๆ 2 สัปดาห์ และชุดที่สองเพาะเลี้ยง ในที่มืดแต่ไม่มีการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่จะให้ปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 30 ซีซี.

3.3.5.1.9 ทำการบันทึกลักษณะรูปร่างสีและน้ำหนักทั้งสดและ น้ำหนักแห้ง(ได้จากการอบแห้ง 24 ชั่วโมง ณ 80 องศาเซลเซียส) เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของคัลลัส และทำการหาปริมาณนิโคติน ในแต่ละช่วง 2 สัปดาห์

3.3.5.1.10 ในการสังเคราะห์นิโคตินทำการทดลองกรณี blank ควบคู่ไปด้วยจึงต้องสร้างชุดควบคุม เนื่องจากคัลลัสสามารถสังเคราะห์นิโคตินโดยไม่อาศัยกรดนิโคตินิก จึงทำการเพาะเลี้ยงในที่มืด แต่เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปราศจาก

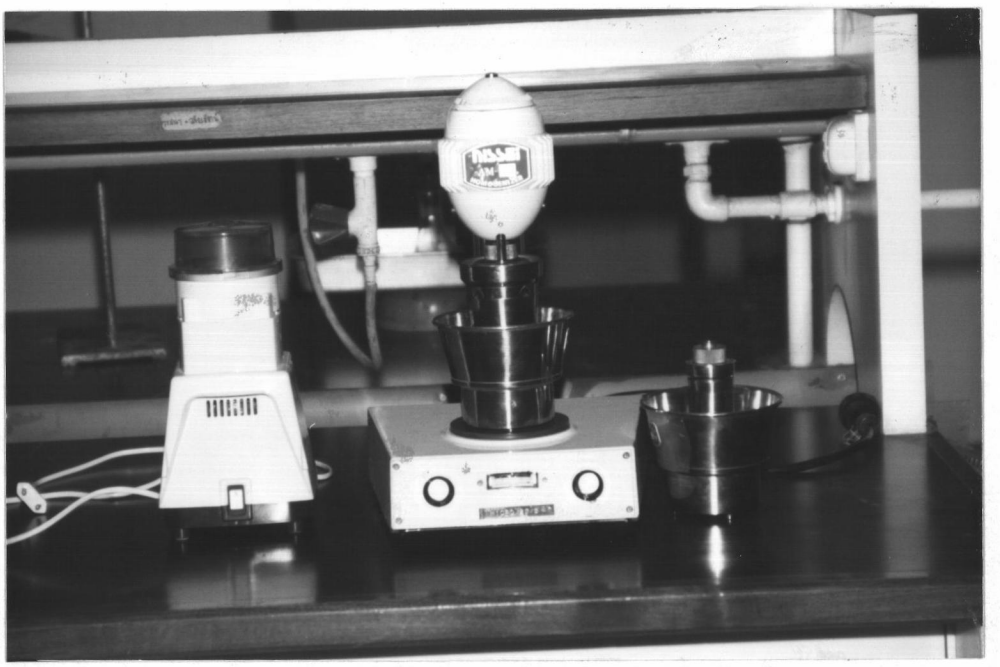
กรดนิโคตินิก 10 ซีซี.ทุกๆ 2 สัปดาห์ และชุดที่สองเพาะเลี้ยงในที่มืดแต่ไม่มีการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปราศจากกรดนิโคตินิก แต่จะให้ปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 30 ซีซี. แล้วจึงทำการเปรียบเทียบกัน

3.3.5.1.11 หลังเปรียบเทียบแล้วว่าชุดใดดี จึงทำการสังเคราะห์นิโคตินกัมมันตรังสีเลียนแบบชุดที่ดีโดยใส่กรดนิโคตินิกกัมมันตรังสี และบันทึกปริมาณกัมมันตรังสีทั้งในรูปการวัดรังสีเบตาและ แกมมาของนิโคตินกัมมันตรังสี แต่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่สังเคราะห์นิโคตินรังสี เพื่อป้องกันอันตรายจากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปนเปื้อนกัมมันตภาพรังสีเนื่องจากในเวลาทำการให้ไร้เชื้อ ถ้าโดยทั่วไปจะทำการให้ไร้เชื้อด้วยการนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอดันที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ณ ความดัน 10 ปอนด์ เพื่อให้การสลายตัวของสารอาหารประเภทวิตามินน้อยที่สุด (28) แต่เมื่อใช้กรดนิโคตินิกกัมมันตรังสี ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การทำให้ไร้เชื้อจะใช้วิธีการฉายรังสีแกมม่า 25 กิโลเกรย์ ณ โรงงานอาบรังสีสำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ (ดูในภาคผนวก ง)

3.3.6 การศึกษาการสกัดนิโคติน และนิโคตินกัมมันตรังสี เป็นกระบวนการที่สกัดนิโคตินที่ได้จากเซลออกมา โดยจะได้นิโคตินออกมาในรูปของสารละลาย ดังนั้นต้องทำการหาปริมาณนิโคตินและตรวจสอบว่ามีเนื้อของนิโคตินในสารละลายปริมาณเท่าใด ในการสกัดนี้แบ่งเป็น 2 วิธี

3.3.6.1 วิธีการของ Lockwood และคณะ,1984 (16)

3.3.6.1.1 น่าคัลลัส 500 กรัม(ชั่งในรูปน้ำหนักสด) มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อเดียวกัน(Homogenizer)ในรูปที่ 3.9 โดยใช้อัตราเร็วในการบด 10000-15000 รอบต่อนาที จะได้สลัดจ์(sludge)น้ำตาลแก่



รูปที่ 3.9 เครื่องบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.3.6.1.2 นำสลัดจ์สีน้ำตาลแก่ผสม กับ 5% กรดอะซีติค 500 มิลลิลิตร ทำการกวนต่อเนื่องนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ภายใต้สูญญากาศ

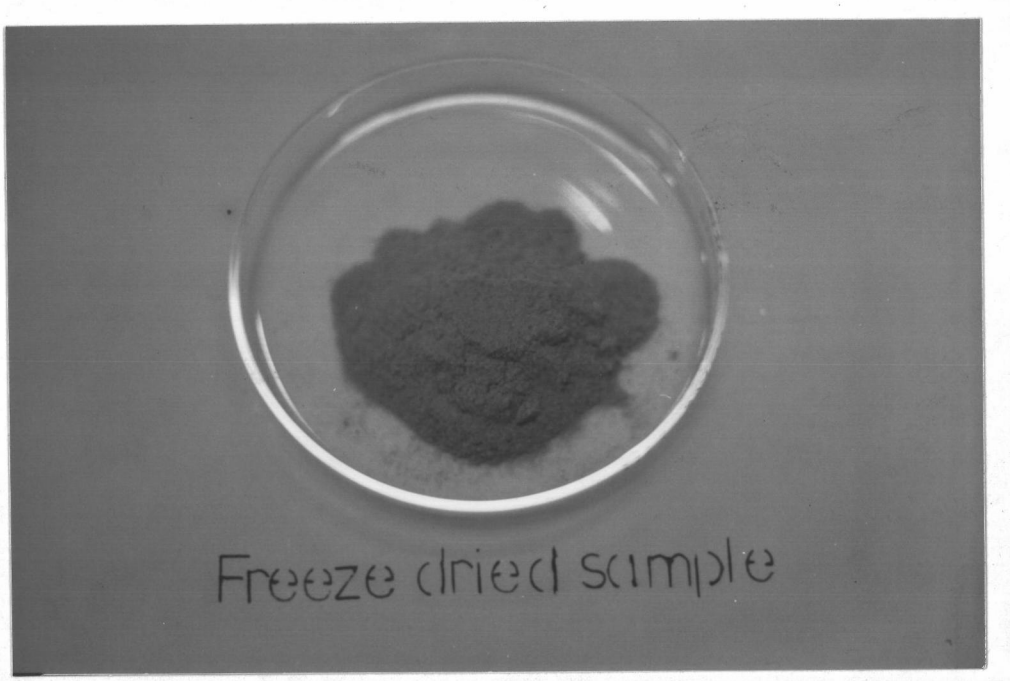
3.3.6.1.3 ทำให้เป็นด่างด้วย 10%NH_4OH ให้ได้พีเอช 9 แล้วจึงแบ่งสารละลายด่างออกมาครั้งละ 100 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 50 มิลลิลิตร 3 ครั้ง แล้วทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศ

3.3.6.1.4 ทำการรีฟลักซ์ด้วย 2 M KOH ในแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วทำการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มซ้ำ แล้วทำการเก็บสารละลายที่ได้นำไปตรวจสอบว่าเป็นนิโคตินด้วยก๊าซโคมาโตรกราฟฟี และทำการหาปริมาณนิโคตินด้วยอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี

3.3.6.2 วิธีการของ Tabata และคณะ (17)

3.3.6.2.1 นำเนื้อเยื่อของคัลลัสมาประมาณ 150 กรัม นำมาบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใช้อัตราเร็ว $1.5x10^3$ รอบ/นาทีทำการบด 15 นาที

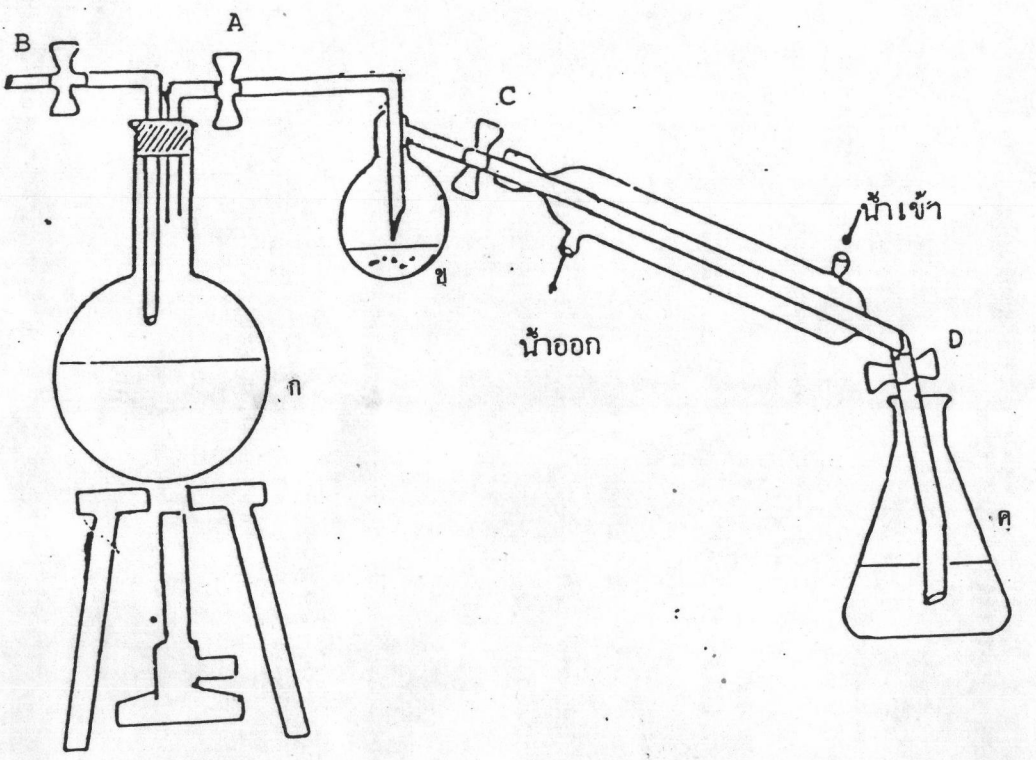
3.3.6.2.2 เมื่อเนื้อเยื่อบดละเอียดจนกลายเป็นลักษณะของเหลวสีโกโก้นำมาทำให้แห้งด้วยเครื่องทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง(Lyophylizer) จะได้เนื้อเยื่อมีลักษณะเหมือนฟองน้ำเป็นแผ่นสีน้ำตาลอ่อน นำไปใส่ในโถทำให้แห้ง(Desicator) จนน้ำหนักคัลลัสที่ผ่านทำให้แห้งด้วยการเยือกแข็งแห้งคงที่ และนำไปบดด้วยเครื่องบดให้เป็นผง (ดูรูปที่ 3.10)



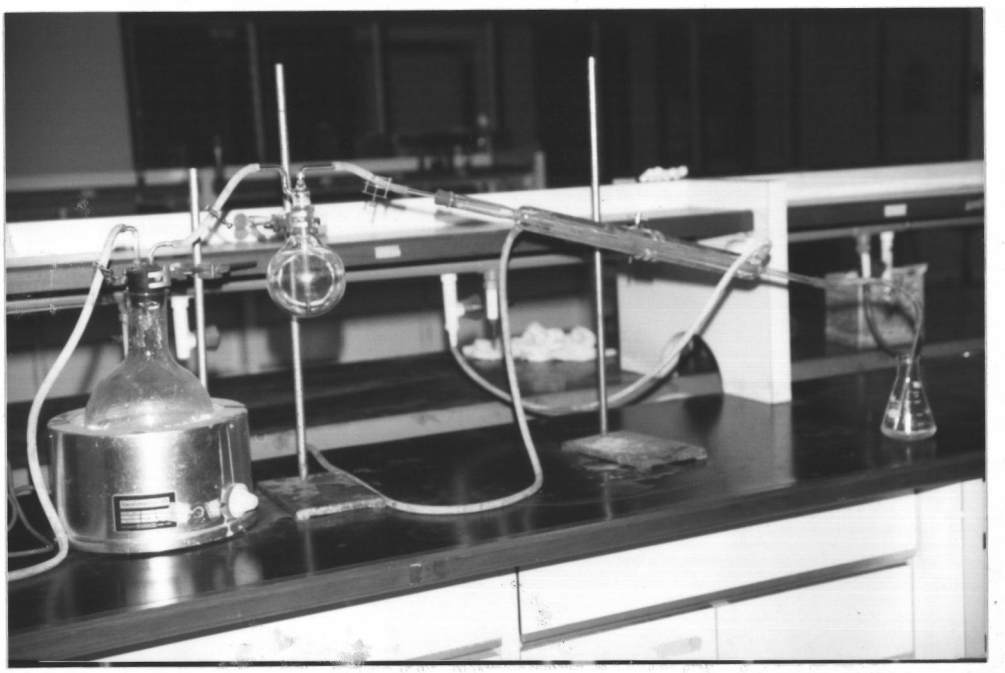
รูปที่ 3.10 คัลลัสที่ทำให้แห้งด้วยวิธีเยือกแข็งซึ่งผ่านการบดละเอียด

3.3.6.2.3 นำเนื้อเยื่อแห้งบดละเอียด 1 กรัมผสมกับ MgO 0.625 กรัม เทใส่ในขวดก้นกลม 500 ซีซี ที่มีตัวกันปะทุ(glass bead) บรรจุอยู่ซึ่งทำหน้าที่

เป็นตัวส่งความร้อนให้ทั่วถึง และนำมากลั่นโดยอุปกรณ์กลั่นด้วยไอน้ำ ดังรูปที่ 3.11 ในรูปที่ 3.11ก.และ 3.11ข.



รูปที่ 3.11 ก.



รูปที่ 3.11ข.

รูปที่ 3.11 ชุดอุปกรณ์กลั่นด้วยไอน้ำ

จากรูปที่ 3.11ก. ปิดลิ้น(vavle) A และเปิดลิ้น B ให้ความร้อนแก่น้ำในขวดก้นกลม ก. 1000 ซีซี จนเดือด แล้วจึงค่อยปิดลิ้น B และเปิดลิ้น A เพื่อให้ไอน้ำผ่านขวดกลั่น ข. ซึ่งบรรจุผงเนื้อเยื่อเยื่อกแข็งแห้ง และ MgO แล้วจึงเปิดลิ้น C และ D ให้ไอน้ำผ่านเครื่องควบแน่น(condenser)กลั่นตัวเป็นสารละลายด่างแล้วไหลลงไปยังขวดรองรับ ค. ที่บรรจุ 30 ซีซี. 0.5 N HCl ให้ได้สารละลายรวม 300 ซีซี.

3.3.6.2.4 นำสารละลายที่กลั่นได้ทำการตรวจสอบว่าเป็นนิโคตินด้วยวิธีก๊าซโคมาโตรกราฟฟี และอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี แล้วจึงนำไปหาปริมาณนิโคตินด้วยอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี

3.3.7 การศึกษาการทำให้นิโคตินกัมมันตรังสีมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น

3.3.7.1 นำเอาสารละลายที่มีนิโคตินกัมมันตรังสี เทสารละลายปริมาตร 30 ซีซี. ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุผง Al_2O_3 ในบิวเรตต์(burette)ขนาด 50 ซีซี. โดยจะมีผง Al_2O_3 อยู่ปริมาณ 40 ซีซี.

3.3.7.2 ทำการเก็บตัวอย่างลาดับส่วนๆละ 40 ซีซี 5 ตัวอย่างแล้วนำเอาเมททานอลละลายสารที่ติดค้างอยู่ในบิวเรตต์แล้วทำการเก็บตัวอย่างเป็นส่วนๆ ที่อยู่ในรูปเมททานอลอีก 5 ตัวอย่าง

3.3.7.3 นำตัวอย่างที่เก็บได้ทั้ง 10 ตัวอย่างไปหาค่าดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปีของนิโคติน และนำเอาแต่ละตัวอย่างที่เก็บ ทำการวิเคราะห์หาส่วน(ตำแหน่ง) ที่คาดว่าจะมีเปอร์เซนต์นิโคตินกัมมันตรังสีสูงสุด และนำตัวอย่างนั้นมากรองผ่านเยื่อมิลลิพอร(miliphoremembrane) 0.2 ไมครอน แล้วนำมาทำให้แห้งโดยวิธีเยือกแข็ง และหาความบริสุทธิโดยใช้อัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี

3.3.7.4 นำสารในข้อ 3.3.7.3 มาทำการหาความแรงกัมมันตภาพรังสีและทำการหาว่ามีสารกัมมันตรังสีใดๆ