บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องสเปกโทรฟลูออโรโฟโตมิเตอร์ (spectrofluorophotometer) รุ่น FP-6200 บริษัท Jasco ประเทศญี่ปุ่น และคิวเวตขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ทศนิยม 5 ตำแหน่ง รุ่น AT 261 Delta Range บริษัท Mettler Toledo Co., LTD. ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Φ 34 ของ Beckman

4. ตู้อบ (Oven) รุ่น 1375 FX ของ SHELLAB, Sheldon manufacturing, INC.

5. ไมโครปิเปต (Micropipet) ขนาด 0.1-10 ไมโครลิตร, 10-100 ไมโครลิตร และ 100-1,000 ไมโครลิตร บริษัท Boeco ประเทศเยอรมัน

สารเคมี

1. สารมาตรฐานบราสสิโนไลด์ (Brassinolide: $C_{28}H_{48}O_6$ มวลโมเลกุล 480.68 กรัมต่อโมล) ความบริสุทธิ์ 90% เกรดวิเคราะห์ ของบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหราชอาณาจักร

2. แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (Dansylaminophenylboronic acid, DABA: $C_{18}H_{19}BN_2O_4S$ มวลโมเลกุล 370.23 กรัมต่อโมล) เกรด HPLC ของบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. เมทานอล (Methanol:CH_3OH มวลโมเลกุล 32.04 กรัมต่อโมล) เกรด HPLC ของบริษัท RCI Labscan ประเทศไทย

4. ไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคะไฮเดรต (Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate: $Na_2HPO_4.12\ H_2O$ มวลโมเลกุล 358.14 กรัมต่อโมล) เกรดวิเคราะห์ ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี

5. โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogenphosphate: KH_2PO_4 มวลโมเลกุล 136.09 กรัมต่อโมล) เกรดวิเคราะห์ ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี

6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide:NaOH มวลโมเลกุล 40.00 กรัมต่อโมล) เกรดวิเคราะห์ ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

7. ไดเมทธิลซัลฟอกซ์ไซด์ (Dimethylsulfoxide:C_2H_6OS มวลโมเลกุล 78.13 กรัมต่อโมล) เกรดสำหรับการสังเคราะห์ ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

8. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37 % (Hydrochloric acid:HCl มวลโมเลกุล 36.46 กรัมต่อโมล) เกรดวิเคราะห์ ของบริษัท RCI Labscan ประเทศไทย

9. เอทธิล อะซิเตท (Ethyl acetate:$C_4H_8O_2$ มวลโมเลกุล 88.11 กรัมต่อโมล) เกรดวิเคราะห์ ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารเคมี

1.1 สารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์

ชั่งสารมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 2.40 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายผสมเมทานอล: น้ำ อัตราส่วน 1:1.5 ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร (เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน)

1.2 สารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (DABA)

ชั่งแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 11.11, 4.44 และ 2.50 มิลลิกรัม ละลายด้วยไดเมทธิลซัลฟอกซ์ไซด์ ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร จะได้ DABA 6.00, 2.40 และ 1.35 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (เตรียมก่อนใช้) จากนั้นนำ DABA 6.00 มิลลิโมลาร์ ไปเจือจางด้วย ไดเมทธิลซัลฟอกซ์ไซด์ เป็นความเข้มข้นต่างๆ ตามต้องการ

1.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ นำไปเจือจางเป็นสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.10 โมลาร์ ปริมาตรตามที่ต้องการ

1.4 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก

ตวงกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37% ปริมาตร 4.2 มิลลิลิตร เทลงในน้ำปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.0 โมลาร์ นำไปเจือจางเป็นสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.10 โมลาร์ ปริมาตรตามที่ต้องการ

1.5 สารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

ชั่งโพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.6 มิลลิกรัม จำนวน 2 ชุด ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 8 มิลลิลิตรในบีกเกอร์ ปรับค่าพีเอชของสารละลายด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.10 โมลาร์ เพื่อให้ได้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 5 และ 6 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10 มิลลิโมลาร์ นำไปเจือจางเป็นสารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5, 1 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรตามที่ต้องการ

1.6 สารละลายบัฟเฟอร์ไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคะไฮเดรต 10 มิลลิโมลาร์

ชั่งไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคะไฮเดรต 35.8 มิลลิกรัม จำนวน 3 ชุด ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 8 มิลลิลิตรในบีกเกอร์ ปรับพีเอชของสารละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.10 โมลาร์ เพื่อให้ได้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7, 8 และปรับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.10 โมลาร์ เพื่อให้ได้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 9 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายบัฟเฟอร์ไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคะไฮเดรต 10 มิลลิโมลาร์ นำไปเจือจางเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคะไฮเดรต 5, 1และ 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรตามที่ต้องการ

1.7 สารละลายน้ำตาล 100 มิลลิโมลาร์

ชั่งน้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง และน้ำตาลอ้อย อย่างละ 0.6846 กรัม ลงในบีกเกอร์ใบที่ 1-3 ตามลำดับ จากนั้นละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 20 มิลลิลิตร

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนไลด์ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์

ปฏิกิริยาระหว่างบราสสิโนไลด์และแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด มีตัวแปรที่ศึกษาดังนี้ คือ ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น (Excitation wavelength, λ_{ex}) และความยาวคลื่นที่สารคายแสง (Emission wavelength, λ_{em}) ค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ อุณหภูมิ ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา และความเข้มข้นของสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด จากนั้นจึงนำสภาวะที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพและปุ๋ยน้ำ

2.1 ความยาวคลื่นที่ใช้ (λ_{ex} และ λ_{em})

ปิเปตสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์ มา 750 ไมโครลิตร และสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 2.4 มิลลิโมลาร์ มา 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 ลงไป 650 ไมโครลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปสแกนหา λ_{ex} และ λ_{em} ด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรโฟโตมิเตอร์ ใช้คิวเวตขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตั้งความกว้างแถบแสงของโมโนโครมาเตอร์ที่ใช้ในการกระตุ้น (excitation monochromator band witdh) เท่ากับ 10 นาโนเมตร และ ความกว้างแถบแสงของโมโนโครมาเตอร์ที่ใช้กับแสงที่คายออกมา (emission monochromator band witdh) เท่ากับ 5 นาโนเมตร เริ่มต้นการสแกนโดยตั้ง λ_{ex} ชั่วคราวไว้ที่ 220 นาโนเมตร แล้วสแกนสเปกตรัมการคายแสงของสารละลายตัวอย่าง จะทำให้ได้ λ_{em} ชั่วคราว จากนั้นใช้ λ_{em} ชั่วคราวที่หาได้ สแกนสเปกตรัมการ

กระตุ้นของสารละลายตัวอย่าง จะทำให้ทราบ λ_{ex} ของสารละลายตัวอย่างที่แท้จริง ใช้ λ_{ex} แท้จริงที่ได้ สแกนสเปกตรัมการคายแสงของสารละลายตัวอย่าง จะทำให้ทราบ λ_{em} ที่ถูกต้อง

2.2 ค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายผสมและทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1 โดยปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 5, 6, 7, 8 และ 9 อย่างละ 650 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 1-5 ตามลำดับ เขย่าสารละลายทุกหลอดให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ ที่ λ_{ex} 380 นาโนเมตร และ λ_{em} 505 นาโนเมตร

2.3 ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายผสมและทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1 โดยในหลอดที่ 1-4 ปรับปริมาตรสารละลายผสมด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในช่วงความเข้มข้น 0.1-10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และปรับปริมาตรสารละลายผสมด้วยน้ำปราศจากไอออน 650 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 5

2.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

เตรียมสารละลายผสมและทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่นำสารละลายผสมไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

2.5 ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

เตรียมสารละลายผสมและทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1 โดยตั้งสารละลายผสมให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 และ 70 นาที ตามลำดับ

2.6 ความเข้มข้นของสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด

เตรียมสารละลายผสมและทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่ปิเปตสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 0.15, 0.45, 0.75, 1.05, 1.35, 1.50, 2.40, 3.00, 4.50 และ 6.00มิลลิโมลาร์ มาอย่างละ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1-10 ตามลำดับ

3. การประเมินประสิทธิภาพของวิธี (Evaluation of method performance)

การประเมินประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับการหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ด้วยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมทรี โดยปัจจัยที่ต้องทำการศึกษา ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง กราฟมาตรฐาน ขีดจำกัดการตรวจวัด ขีดจำกัดการหาปริมาณ ความเที่ยง ผลของน้ำตาลต่อการรบกวนการวิเคราะห์ และค่าร้อยละการได้กลับคืน

3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์ มา 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 300, 450, 600, 750, 900 และ 1,200 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1-15 ตามลำดับ โดยในแต่ละหลอดมีสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 1.35 มิลลิโมลาร์ 100 ไมโครลิตรบรรจุอยู่ ปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดบอกปริมาตรที่ 1.5 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7 เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ ที่ λ_{ex} 380 นาโนเมตร และ λ_{em} 505 นาโนเมตร

3.2 กราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

เตรียมสารละลายผสมและทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.5.1 แต่ปิเปตสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์ มา 15, 75, 150, 300, 450, 600 และ 750 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1-7 ตามลำดับ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปทำการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ต่อไป

3.3 ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดการหาปริมาณ (Limit of quantification, LOQ)

ปิเปตสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 1.35 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7 ลงไป 1,400 ไมโครลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ ที่ λ_{ex} 380 นาโนเมตร และ λ_{em} 505 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่า LOD (*3SD/slope*) และ LOQ (*10SD/slope*)

3.4 ความเที่ยง (Precision)

- ความเที่ยงภายในวัน (Intra-day Precision)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์ มา 75, 150 และ 600 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1-3 ตามลำดับ โดยในแต่ละหลอดมีสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 1.35 มิลลิโมลาร์ 100 ไมโครลิตรบรรจุอยู่ ปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดบอกปริมาตรที่ 1.5 มิลลิลิตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7 เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ ที่ λ_{ex} 380 นาโนเมตร และ λ_{em} 505 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation หรือ % RSD)

- ความเที่ยงระหว่างวัน (Inter-day Precision)

เตรียมสารละลายผสมและทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ความเที่ยงภายในวัน โดยเตรียมสารสารละลายผสมใหม่และวิเคราะห์ทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation หรือ % RSD)

3.5 ผลของน้ำตาลต่อการรบกวนการวิเคราะห์

- ผลของน้ำตาลต่อการทำปฏิกิริยากับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด

ปิเปตสารละลายน้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง และน้ำตาลอ้อย 100 มิลลิโมลาร์ มาอย่างละ 15, 60, 100, 300, 600 และ 900 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1-6 ตามลำดับ โดยในแต่ละหลอดมีสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 1.35 มิลลิโมลาร์ 100 ไมโครลิตรบรรจุอยู่ จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดบอกปริมาตรที่ 1.5 มิลลิลิตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชเท่ากับ 7 เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ ที่ λ_{ex} 380 นาโนเมตร และ λ_{em} 505 นาโนเมตร

- ผลของน้ำตาลต่อการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ของบราสสิโนสเตียรอยด์

ปิเปตสารละลายน้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง และน้ำตาลอ้อย 100 มิลลิโมลาร์ มาอย่างละ 600 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1-3 ตามลำดับ จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์ 150 ไมโครลิตร และสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 1.35 มิลลิโมลาร์ 100 ไมโครลิตร ใส่ตามลงไปทุกหลอด สุดท้ายปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดบอกปริมาตรที่ 1.5 มิลลิลิตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชเท่ากับ 7 เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ ที่ λ_{ex} 380 นาโนเมตร และ λ_{em} 505 นาโนเมตร

3.6 การหาค่าร้อยละการได้กลับคืน (% Recovery)

ทำการทดสอบโดยการหาค่าร้อยละการกลับคืนในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ และตัวอย่างปุ๋ยน้ำ โดยทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 22 ตัวอย่าง จำแนกเป็นตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ 18 ตัวอย่าง และตัวอย่างปุ๋ยน้ำ 4 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ความเข้มข้น ดังนี้

- ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ

กรองตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และปิเปตมา 200-700 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับสีและความเข้มข้นของตัวอย่าง หรือนำตัวอย่างที่กรองแล้วไปเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนในอัตราส่วน 1:2-1:10 ก่อนที่จะปิเปตมาทำปฏิกิริยา จากนั้นปิเปตสารละลาย

มาตรฐานบราสสิโนไลด์ 100 ไมโครโมลาร์ ที่ 4 ระดับความเข้มข้นระหว่าง 0-4 เท่าของความเข้มข้นของบราสสิโนไลด์ที่มีอยู่ในตัวอย่างเริ่มต้น และปิเปตสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 1.35 มิลลิโมลาร์ มา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดบอกปริมาตรที่ 1.5 มิลลิลิตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชเท่ากับ 7 เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ ที่ λ_{ex} 380 นาโนเมตร และ λ_{em} 505 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนไลด์ (% Recovery)

- ***ตัวอย่างปุ๋ยน้ำ***

ปิเปตตัวอย่างปุ๋ยน้ำ หรือปุ๋ยน้ำที่เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนในอัตราส่วน 1:40 หรือ 1:100 มา 20-400 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับสีและความเข้มข้นของตัวอย่าง ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปิเปตสารละลายและทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ

4. การวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์ในตัวอย่างด้วยวิธี Standard Addition

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองการหาค่าร้อยละการได้กลับคืนมาคำนวณหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไรด์ ในตัวอย่างต่าง ๆ ด้วยวิธี Standard Addition โดยการสร้างกราฟระหว่างค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไรด์ที่เติม จากนั้น แทนค่า $y = 0$ ลงในสมการเส้นตรงของกราฟที่ได้แล้วหาค่า x ก็จะทำให้ทราบปริมาณของฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไรด์ ในตัวอย่างได้