

บทที่ 3

วิธีทดลอง

3.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. Autoclave รุ่น H-88 LLD, Kokusan, Japan.
2. Hot air oven รุ่น U-40, Memmert, Japan.
3. pH meter, Suntex, Taiwan.
4. Double distillation water; Aquasave 2000, Hamilton Laboratory Glass LTD., USA.
5. Deionization water; Osma Orion, Osmonics Inc, USA.
6. Refrigerator centrifuge รุ่น Himae CR 20 B2, Hitachi, Japan.
7. Shaker รุ่น Unimax 2010 Heidolph, Germany.
8. Vortex mixture รุ่น Reax 2000 Heidolph, Germany.
9. Low Pressure Rotary evaporator R-114, water bath B-480, vacuum system B-169, Buchi, Switzerland.
10. UV-Visible Spectrophotometer, Hitachi 330, Japan.
11. Analytical balance ; Sartorius , Germany.
12. Lyophilizer , FTS Systems Stone Ridge, New York , USA.
13. Column 4x60 cm บรรจุ Amberlite XAD-4 resin สูง 50 cm
14. Column 2.5 x 60 cm บรรจุ Bio-Gel P-2 gel สูง 50 cm
15. Water bath, Lauda, Germany.
16. Syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร ; Luer Lock, Becton Dickinson, Singapore.
17. Filter ขนาด 0.45 μm เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.7 cm HA; Millipore Coporation, USA.
18. เครื่องกรองสารละลายของ HPLC ; Millipore Coporation, USA.
19. Ultrasonic Bath; Branson a Smithkline Company, USA.
20. คอลัมน์ที่ใช้กับ HPLC; $\mu\text{Bondapak C-18}$, size 3.9 x 300 mm)
21. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง Waters Associates,

Abs detector Model 440, Waters 501 HPLC pump, USA.

22. Omniscribe recorder ; Houston instrument, Austin, Texas, USA.

3.2 สารเคมี

1. acetic acid; CH_3COOH , AR grade, Carlo Erba, USA.
2. Amberlite XAD-4 resin; Sigma Chemical Co., USA.
3. ammonium iron(II) sulfate-6-hydrate, $(\text{NH}_4)_2 [\text{Fe}(\text{SO}_4)_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, AR grade, Merck , Germany.
4. L-Asparagine anhydrous, AR grade, Fluka Biochemika, Switzerland.
5. Bio-Gel P-2 gel, Bio-Rad Laboratory , USA.
6. citric acid; $\text{COOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{C}(\text{OH}) \cdot \text{COOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, AR grade, Ajax Chemicals, Australia.
7. concentrated hydrochloric acid ; 37 % HCl , AR grade . Carlo Erba, USA.
8. di-sodium hydrogenphosphate dihydrate; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. AR grade, Fluka - Garantie , Switzerland.
9. ethanol; $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, AR grade, Carlo Erba, France.
10. ferric chloride anhydrous; FeCl_3 , AR grade, Fluka Chemica, Germany.
11. 8-hydroxy quinoline; $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}$, AR grade, Sigma Chemicals, USA.
12. iodine; I_2 , AR grade, Merck, Germany.
13. magnesium sulfate heptahydrate; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, AR grade, Fluka Chemica, Switzerland.
14. methanol ; CH_3OH , AR grade, BDH Laboratory Supplies Pools. England.
15. methanol; CH_3OH , HPLC grade, Mallinckrodt, USA.
16. N-(1-Naphthyl)ethylenediamine; $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$, AR grade , Serva Fein Bio Chemica GmbH and Co.KG, Germany.
17. 1,10-phenanthroline monohydrate; $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, AR grade, Merck, Germany.
18. potassiumdihydrogenphosphate; KH_2PO_4 , AR grade, Fluka Chemica, Switzerland.
19. potassium iodine; KI , AR grade, Ajax Chemicals, Australia.

20. pyridine; C_5H_5N , AR grade, Merck, Germany.
21. sodium acetate; CH_3COONa , AR grade, Carlo Erba, USA.
22. sodium arsenite; $NaAsO_2$, AR grade, Carlo Erba, France.
23. sodium carbamate; Na_2CO_3 , AR grade, Merck, Germany.
24. sodium hydroxide; $NaOH$, AR grade, Ajax Chemicals, Australia.
25. sodium molybdate; Na_2MoO_4 , AR grade, Merck, Germany.
26. sodium nitrite; $NaNO_2$, AR grade, Riedel-deHaen, Germany.
27. Sucrose; $C_{12}H_{22}O_{11}$, AR grade, Merck, Germany.
28. sulfuric acid; H_2SO_4 , AR grade, Mallinckrodt, USA.
29. sulphanilamide, $NH_2 \cdot C_6H_4 \cdot SO_2 \cdot NH_2$, AR grade, BDH Chemicals Ltd Poole England.
30. triphenyltetrazolium chloride; $C_{19}H_{15}ClN_4$, AR grade, Fluka Biochemika, Switzerland.

3.3 การเตรียมสารละลายสำหรับผลิตไซเคอโรฟอร์

3.3.1 การเตรียมอาหารเหลว SA

อาหารเหลว SA 2.00 L ประกอบด้วยซูโครส 40.00 g แอล-แอสพาราจีน 4.00 g โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต 2.00 g ถ่ายลงใน erlenmeyer flask ขนาด 5.00 L ละลายน้ำปราศจากไอออน หลังจากนั้นแบ่ง 100.00 cm³ ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 250.00 cm³ แล้วปรับ pH เป็น 6.80 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และซังแมกนีเซียม ซัลเฟต 10.00 g ในน้ำ 100.00 cm³ นำสารละลายทั้งหมดไปฆ่าเชื้อใน autoclave เป็นเวลา 15 นาที ที่ 121 °C ปลอ่ยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.3.2 การผลิตไซเคอโรฟอร์

นำสารละลายทั้งหมดที่ผ่านการฆ่าเชื้อใน autoclave ไปฆ่าเชื้ออีกครั้งภายใต้แสง UV เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที แล้วบีบอัด สารละลายแมกนีเซียม ซัลเฟต ลงในอาหาร SA 1.00 cm³/100.00 cm³ นำแบคทีเรียสายพันธุ์ *Ps. aeruginosa* โดยชุดเชื้อที่อยู่บนเพลตลงใน erlenmeyer flask ขนาด 250.00 cm³ มีอาหารเหลว SA 100.00 cm³ นำไปเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 250 rpm ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายใน erlenmeyer flask ขนาด 250.00 cm³ ไปถ่ายลงใน erlenmeyer flask

ขนาด 5.00 L ในตู้ UV คนด้วย magnetic stirrer ต่อไปอีก 24 ชั่วโมง ด้วยความเร็ว 1,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายสีเขียวอมเหลือง

หลังจากเลี้ยง *Ps. aeruginosa* ในอาหารเหลว SA 24 ชั่วโมง จะได้สารละลายสีเขียวเหลือง นำมาเติมแอมโมเนียม ซัลเฟต 10.00 g เพื่อตกตะกอนโปรตีน (ถ้าต้องการผลิตในรูปสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก-ไซเคโอโรฟอรัสต้องเติมเฟอร์ริก คลอไรด์ 1.00 g/L ของอาหารเหลวเพิ่มลงไป) และนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อแยกโปรตีนและเซลล์ออกไป ได้สารละลายส่วนใสที่เรียกว่า siderophore supernatant

จากนั้นนำสารละลายส่วนใสนี้ไปผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-4 resin หลังจากชะล้างคอลัมน์ให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นแล้ว ทำการชะไซเคโอโรฟอรัสด้วยเมทานอล : น้ำ จะได้ crude siderophores ลดปริมาตรลงเหลือประมาณ 1-2 cm³ แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านลงในคอลัมน์ Bio-Gel P-2 gel เก็บแต่ละแถบ (band) แยกกัน ลดปริมาตรลงเหลือประมาณ 5-10 cm³ แล้วทำให้แห้งโดยการ lyophilization จะได้ผงไซเคโอโรฟอรัสเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.4 การเตรียมสารละลายสำหรับการแยกและทำให้ไซเคโอโรฟอรัสบริสุทธิ์

ก. สารละลายเมทานอล 90.00 %

นำเมทานอล มา 900.00 cm³ และน้ำปราศจากไอออน 100.00 cm³ เขย่าให้ผสมกัน

ข. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.00 M

นำกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น มาจำนวน 83.00 cm³ ลงในขวดขนาด 1.00 L ที่มีน้ำปราศจากไอออนบรรจุอยู่แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1.00 L ด้วยน้ำปราศจากไอออน เขย่าให้ผสมกัน

ค. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 M

ชั่งโซเดียม ไฮดรอกไซด์ 4.00 g ละลายในบีกเกอร์ขนาด 250.00 cm³ ปรับปริมาตรให้เป็น 100.00 cm³ ด้วยน้ำปราศจากไอออน

ง. สารละลายเมทานอล : สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (1.00 M) = 9:1 v/v

นำเมทานอลมา 900.00 cm³ ผสมกับ 1.00 M สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 100.00 cm³ เขย่าให้ผสมกัน

จ. สารละลาย 0.05 M ของฟิรีดิน-อะซีเตต บัฟเฟอร์ (pH 6.04)

นำฟิรีดินมาจำนวน 4.00 cm³ และกรดอะซีติก 0.40 cm³ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1.00 L ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน วัด pH ด้วยเครื่อง pH meter แล้วทำการปรับ pH ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.00 M และ/หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 M

3.4.1 วิธีการแยก

ก. นำสารละลายที่ได้จากการเลี้ยงไปเติมแอมโมเนียม ซัลเฟต เพื่อตกตะกอนโปรตีน จำนวน 10.00 g/L ของอาหารเหลว SA และถ้าแยกในรูปของเหล็ก-ไซเคอโรฟอร์ให้เติมเฟอร์ริก กลอไรด์ 1.00 g/L เพิ่มลงไปแล้วปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 6.00-7.00 แล้วนำไปเหวี่ยงด้วย เครื่อง Refrigerator centrifuge เป็นเวลา 15 นาที ด้วย ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C

ข. ล้างคอลัมน์ที่จะใช้แบบ Amberlite XAD-4 resin ด้วยน้ำกลั่นให้สะอาดจนเป็นกลาง โดยทดสอบด้วยกระดาษลิตมัสจากส่วนน้ำทิ้ง

ค. นำสารละลาย siderophore supernatant (สีเขียวอมเหลือง หรือสีน้ำตาล) ผ่านลงไป ในคอลัมน์ แบบ Amberlite XAD-4 resin จะด้วยอัตราการไหลประมาณ 5 - 10 cm³/min และสามารถ ผ่าน siderophore supernatant ได้ไม่น้อยกว่า 1.00-2.00 L

ง. หลังจากผ่านสารละลาย siderophore supernatant ลงในคอลัมน์จนหมดแล้วล้าง คอลัมน์ให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นจำนวนมากๆ เพื่อกำจัดสารอาหาร เกือบต่างๆ และอื่นๆจนหมด สังเกตจากน้ำกลั่นที่ล้างในส่วนล่างจะต้องใส

จ. สะคอลัมน์ด้วยเมทานอล : น้ำ (9:1) เก็บแถบส่วนที่เป็นสีเขียวอมเหลือง หรือ สีฟ้า เท่านั้น และเก็บแยกกันเป็นส่วนๆ

ฉ. รวบรวมสารละลายที่เก็บได้ทุกส่วน นำสารละลายไซเคอโรฟอร์ที่แยกได้ไปลด ปริมาตรลง โดยใช้เครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิไม่เกิน 38 °C

ช. พยายามลดปริมาตรให้เหลือ ประมาณ 1-2 cm³ นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ก่อนนำไปศึกษาขั้นตอนต่อไป

3.4.2 วิธีการทำให้บริสุทธิ์

ก. เตรียมคอลัมน์ของ Bio-Gel P-2 gel ให้พร้อม โดยการ equilibrate ด้วย 0.05 M พรีดีน-อะซีเตต บัฟเฟอร์ (pH 6.04)

ข. นำสารละลายเข้มข้นจากวิธีการแยก (ข้อ 3.4.1) ที่ลดปริมาตรลงเหลือประมาณ 1-2 cm³ ผ่านลงในคอลัมน์ Bio-Gel P-2 gel

ค. เก็บแถบที่มีสีทุกส่วนแยกออกจากกัน ไซเคอโรฟอร์บริสุทธิ์ที่แยกได้นำไป lyophilization ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา เพื่อนำไปศึกษาสมบัติ และปัจจัยต่างๆ

3.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไซเคโอโรฟอร์ด้วยเทคนิค HPLC

3.5.1 การเตรียมสารละลาย

ก. การเตรียมสารละลายอะซีเตต บัฟเฟอร์ 0.005 M (pH 6.02)

ชั่ง โซเดียมอะซีเตต 0.41 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตร 1.00 L แล้วปรับ pH ด้วยกรดอะซิติก 1.00 M และ/หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 M จนได้ pH 6.02

ข. เตรียม Mobile Phase

ดวงอะซีเตต บัฟเฟอร์ ปริมาตร 920.00 cm³ ผสมกับเมทานอล (HPLC grade) 80.00 cm³

ค. เตรียมสารละลาย Regenerate Column

ดวงเมทานอล (HPLC grade) ปริมาตร 250.00 cm³ ผสมกับ น้ำกลั่นปริมาตร 250.00 cm³

ง. สารตัวอย่างของไซเคโอโรฟอร์ที่ผ่านคอลัมน์ Bio-Gel P-2 เข้มข้น 0.50 % w/v
ซึ่งผงไซเคโอโรฟอร์ 0.50 g ละลายน้ำ 100.00 cm³

3.5.2 วิธีการทดลอง

equilibrate คอลัมน์ด้วยเมทานอล 50.00 % เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที แล้วผ่าน mobile phase ของอะซีเตตบัฟเฟอร์ จน base line คงที่ แล้วฉีดสารตัวอย่าง ได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 4.2 และตารางที่ 4.4

สภาวะที่ใช้ทดลอง

Column	= μ Bondapak C-18, size 3.9 x 300 mm.
Mobile phase	= acetate buffer/MeOH HPLC grade 92:8 (v/v)
Attenuation	= 0.05
Flow rate	= 1.00 ml/min
Pressure	= 1,000 psi
Detector	= Ultraviolet Detector
λ	= 254 nm
Sample volume	= 20.00 μ l
Chart format	= 0.50 cm/min

3.6 การเตรียมสารละลายสำหรับตรวจสอบประเภทของไซเคอร์ฟออร์

มีหลักการทั่วๆ ไปดังนี้

ก. Csaky test ถือว่าเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ hydroxamic acid ด้วยไฮโอซีนเกิดสารประกอบไนโตรโซ (Nitroso) ได้สารละลายสีคราม

ข. Berg & Becker test (Indooxine Method) โดย hydroxylamine จะทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์เกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ green indooxine สีน้ำเงินอมเขียว

ค. Triphenyltetrazolium Chloride (TTC) อาศัยการ hydrolysis ของ hydroxamic acid ให้สารสีแดงกับ TTC ที่อุณหภูมิ 80°C เวลาไม่เกิน 5 นาที

ง. Arnow test เป็นการทดสอบ catecholate โดยสารนี้จะทำปฏิกิริยากับกรดไนตริกให้สารละลายสีเหลือง แล้วสีเหลืองจะเปลี่ยนเป็นสีส้มแดงเข้มกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มากเกินไป

3.6.1 การเตรียมสารละลายสำหรับตรวจสอบไฮดรอกซามาเทไซเคอร์ฟออร์

ก. สารละลายกรดซัลฟิวริก 3.00 M

ปิเปตกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 16.70 cm^3 ปรับปริมาตร ด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 100.00 cm^3

ข. สารละลายโซเดียมอะซิเตต 2.00 M

ชั่งโซเดียมอะซิเตตมา 41.00 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 250.00 cm^3

ค. สารละลายซัลฟานิลามิดเข้มข้น $1.00\% \text{ w/v}$

ชั่งซัลฟานิลามิด 1.00 g ละลาย ใน $30.00\% \text{ v/v}$ กรดอะซิติก 100.00 cm^3

ง. สารละลายไฮโอซีนเข้มข้น $0.65\% \text{ w/v}$

ชั่งไฮโอซีน 0.65 g ละลายใน $1.00\% \text{ w/v}$ ของสารละลายโพแทสเซียมไฮโอไดด์ (KI) 100.00 cm^3

จ. สารละลายโซเดียมอาร์ซีไนต์เข้มข้น $1.50\% \text{ w/v}$

ชั่งโซเดียมอาร์ซีไนต์ 1.50 g ละลายในน้ำปราศจากไอออน 100.00 cm^3

ฉ. สารละลาย แนพทิลเอธิลีนไดเอมีนเข้มข้น $0.05\% \text{ w/v}$

ชั่ง แนพทิลเอธิลีนไดเอมีน 0.05 g ละลายในน้ำปราศจากไอออน 100.00 cm^3

ช. สารละลาย 8-ไฮดรอกซีควิโนลีนเข้มข้น $1.00\% \text{ w/v}$

ชั่ง 8-ไฮดรอกซีควิโนลีน 1.00 g ละลายใน $99.99\% \text{ เอทานอล}$ 100.00 cm^3

ข. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 1.00 M

ซึ่งโซเดียมคาร์บอเนต 53.00 g ละลายน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตร เป็น 500.00 cm³

ฅ. สารละลายไตรฟีนิลเตตระโซเลียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.50 % w/v

ซึ่งไตรฟีนิลเตตระโซเลียมคลอไรด์ 0.50 g ละลายในน้ำ 100.00 cm³

ญ. สารละลายแอซิด-ไพริดีน รีเอเจนต์ เข้มข้น 15.00 % v/v

โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 75.00 cm³ : ปริติ 500.00 cm³

ตารางที่ 3.1 ไอโคโรฟอร์จากสายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบเพื่อแยกประเภท ไอโคโรฟอร์

สารที่	สาร	สีของสารละลาย
1	siderophore supernatant	เขียวเหลือง
2	siderophore ผ่าน XAD-4	เขียวเหลือง
3	siderophore pure (F ₁)	เหลืองเข้ม
4	siderophore pure (F ₂)	ฟ้า
5	siderophore pure (F ₃)	เหลือง
6	siderophore cpx (F ₁)	น้ำตาลเข้ม
7	siderophore cpx (F ₂)	ม่วง
8	siderophore cpx (F ₃)	น้ำตาล
9	siderophore cpx AE ₃ (F ₁)	น้ำตาลแดง
10	siderophore cpx AE ₁₁ (F ₁)	น้ำตาล
11	siderophore cpx AE ₁₁ (F ₂)	น้ำตาล
12	siderophore cpx AE ₁₁ (F ₃)	เหลือง
13	siderophore cpx AE ₁₄ (F ₁)	น้ำตาล
14	siderophore cpx AE ₁₄ (F ₂)	น้ำตาล
15	siderophore cpx AE ₁₄ (F ₃)	เหลือง
16	siderophore cpx AE ₂₂ (F ₁)	น้ำตาล
17	siderophore cpx AE ₂₂ (F ₂)	น้ำตาลแดง
18	siderophore cpx S ₂ E ₅ (F ₁)	น้ำตาลแดง
19	siderophore cpx S ₂ E ₄ (F ₂)	น้ำตาล
20	standard; hydroxylamine	ใส

ซึ่งผงไซเคโอโรฟอร์ จากตารางที่ 3.1 นี้ 0.50 g ละลายในน้ำกลั่น 100.00 cm³ เก็บในขวดพลาสติกขนาด 125.00 cm³ เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.6.2 วิธีการตรวจสอบไฮดรอกซามेतไซเคโอโรฟอร์⁽³¹⁾

นำสารละลายของไซเคโอโรฟอร์ที่เตรียมไว้ในตารางที่ 3.1 มาทำการตรวจสอบไฮดรอกซามेतไซเคโอโรฟอร์ ด้วยวิธีการต่างๆ ดังต่อไปนี้

ก. Csaky test

วิธีทดลอง

ปิเปตสารตัวอย่าง จำนวน 2.00 cm³ ลงในหลอดทดลองขนาด 15.00 cm³ เติมน้ำละลายของกรดซัลฟิวริก 3.00 M จำนวน 2.00 cm³ แล้ว hydrolyzed ในตู้อบเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 120 °C ปลดปล่อยไอน้ำที่อุณหภูมิห้อง แล้วถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50.00 cm³ และเติมน้ำละลาย 2.00 M ของโซเดียมอะซีเตต จำนวน 7.00 cm³ จากนั้น เติมน้ำละลายซัลฟานิลามิด จำนวน 2.00 cm³ และสารละลายไอโอดีน จำนวน 2.00 cm³ เขย่าให้ผสมกัน และปล่อยให้ทำปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์เป็นเวลา 5 นาที ไอโอดีนที่มากเกินไปกำจัดโดยเติมน้ำละลายโซเดียมอาร์ซีไนต์ 2.00 cm³ เติมน้ำละลายเนพริลเอธิลีน ไดเอมีน จำนวน 2.00 cm³ ปลดปล่อยไว้ 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ จะได้สารละลายสีคราม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 543 nm ได้ผลดังรูปที่ 4.3 และ ตารางที่ 4.5

ข. Berg และ Becker test

วิธีทดลอง

เติมน้ำตัวอย่าง จำนวน 2.00 cm³ ลงในบีกเกอร์ขนาด 50.00 cm³ เติมน้ำ 8-hydroxy quinoline จำนวน 2.00 cm³ และสารละลายโซเดียม คาร์บอเนต 1.00 M จำนวน 2.00 cm³ เขย่า 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ แล้วเติมน้ำละลายไฮดรอกไซด์ 14.00 cm³ ของ 1.00 M และ 2.00 cm³ ของ 1.00 M โซเดียม คาร์บอเนต เพื่อไฮโดรไลซิส สารผสม ปรับ pH ให้คงที่ที่ 11.00 ± 0.50 จะได้สารละลายสีน้ำเงินอมเขียว วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 nm ได้ผลดังรูปที่ 4.4 และ ตารางที่ 4.6

ค. Triphenyltetrazolium Chloride test

วิธีทดลอง

เติมสารตัวอย่างจำนวน 10.00 cm^3 ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 50.00 cm^3 แช่อยู่ในอ่างน้ำร้อน ที่อุณหภูมิ $80 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ เติมโซเดียม ไฮดรอกไซด์ 1.00 M 10.00 cm^3 และสารละลาย Triphenyltetrazolium Chloride จำนวน 2.00 cm^3 เขย่าให้ผสมกัน หลังจากนั้น 5 นาที เติมแอซิด-พริคินจำนวน 10.00 cm^3 แล้วเอาออกจากอ่างน้ำ ปล่อยให้เย็น ถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50.00 cm^3 ปรับ ให้ถึงปริมาตรด้วยแอซิด-พริคิน จะได้สารละลายสีส้มแดง ส่วนแบลงค์ (blank) ใช้น้ำกลั่นจำนวน 10.00 cm^3 ทดลองเหมือนข้างต้น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm ได้ผลดังรูปที่ 4.5 และ ตารางที่ 4.7

3.6.3 การเตรียมสารละลายสำหรับตรวจสอบแคทีโกละ⁽¹¹⁾

ก. สารละลายไนไตรต์-โมลิบดีเคท รีโอเจนต์

ชั่งโซเดียมไนไตรต์ 10.00 g และ โซเดียมโมลิบดีเคท 10.00 g ละลาย ใน 100.00 cm^3 ของน้ำปราศจากไอออน

ข. สารละลายโซเดียมไนไตรต์ 250.00 ppm

ชั่งโซเดียมไนไตรต์ 0.25 g ละลายน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตร ในขวดวัดปริมาตรจนครบ 1.00 L

ค. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.50 M

ปิเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.00 M มาจำนวน 50.00 cm^3 ปรับปริมาตร ในขวดวัดปริมาตร เป็น 100.00 cm^3

ง. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 M

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.00 g ละลายน้ำ และปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตร เป็น 100.00 cm^3

3.6.4 การวิเคราะห์แคทีโกละ ไซเดอโรฟอร์ (catecholate siderophore, phenolate) โดย

วิธีของ Arnow

วิธีทดลอง

เติมสารละลายตัวอย่างของไซเดอโรฟอร์ลงในหลอดทดลองขนาด 5.00 cm^3 เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.00 cm^3 และเติมสารละลายไนไตรต์-โมลิบดีเคท 1.00 cm^3 เขย่าให้

ผสมกัน แล้วเติมสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 cm^3 เขย่าให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm ได้ผลดังรูปที่ 4.6 และ ตารางที่ 4.8

3.7 การศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของไซเดอโรฟอร์ ที่ผลิตได้ และสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก-ไซเดอโรฟอร์

3.7.1 การเตรียมสารละลาย

ก. สารละลายของไซเดอโรฟอร์ที่ผลิตได้ 100.00 ppm ($\text{pH} \sim 5$)

เปิดสารละลายของไซเดอโรฟอร์ที่ผลิตได้จากสต็อก 200.00 ppm มา 50.00 cm^3 ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100.00 cm^3 ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

ข. สารละลายของสารประกอบเชิงซ้อนเหล็ก-ไซเดอโรฟอร์ 100.00 ppm ($\text{pH} \sim 4$)

ชั่งสารประกอบเชิงซ้อนเหล็ก - ไซเดอโรฟอร์ มา 0.05 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดวัดปริมาตรขนาด 500.00 cm^3

3.7.2 วิธีการทดลองเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อสเปกตรากการดูดกลืนแสงของ

ไซเดอโรฟอร์บริสุทธิ์ และสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก-ไซเดอโรฟอร์

เปิดสารละลายตัวอย่างไซเดอโรฟอร์บริสุทธิ์ และสารประกอบเชิงซ้อนเหล็ก - ไซเดอโรฟอร์ 5.00 cm^3 ลงในหลอดทดลองขนาด 15.00 cm^3 แล้วนำไปแช่ในตู้เย็นหรือตู้อบ ที่อุณหภูมิ 0, 4, 37, 40, 80, 100, 120, 150 และ $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ตามลำดับ เป็นเวลานาน 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้สภาวะของการทดลองข้างล่างได้ผลดังตารางที่ 4.9, 4.10 และรูปที่ 4.7 , 4.8 ตามลำดับ

สภาวะที่ใช้ทดลอง

λ_{range}	= $500\text{-}300\text{ nm}$
Scan speeds	= 300 nm/min
Scale	= $0.00\text{-}1.00$
Slit Width	= 2 nm
Chart format	= 20 nm/cm

3.7.3 วิธีการทดลองเพื่อศึกษาผลของแสงจากหลอด daylight กำลัง 60 W ณ เวลาต่างๆ กัน ต่อสเปกตรากการดูดกลืนแสงของไซโคโรฟอรที่ผลิตได้ และสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก-ไซโคโรฟอร

ปีเปิดสารละลายไซโคโรฟอร 5.00 cm^3 ลงในหลอดทดลองขนาด 15.00 cm^3 ปิดจุกให้สนิทนำไปวางไว้ภายใต้แสงจากหลอด daylight ที่มีกำลังไฟฟ้า 60 W และเก็บสารละลายตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.7.2 ได้ผลดังตารางที่ 4.11 , 4.12 และรูปที่ 4.9 , 4.10 ตามลำดับ

3.7.4 วิธีการทดลองเพื่อศึกษาผลของ pH ต่อสเปกตรากการดูดกลืนแสงของไซโคโรฟอรที่ผลิตได้ และสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก-ไซโคโรฟอร

ปีเปิดสารละลายไซโคโรฟอร 5.00 cm^3 ลงในบีกเกอร์ขนาด 50.00 cm^3 ปรับ pH ให้เป็น 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 , 10 , 11 , 12 และ 13 ตามลำดับ ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก และ/หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 M ปรับปริมาตรให้เท่ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.7.2 ได้ผลดังตารางที่ 4.13 , 4.14 และรูปที่ 4.11 , 4.12 ตามลำดับ

3.7.5 วิธีการทดลองเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิ 37°C ต่อสเปกตรากการดูดกลืนแสงของไซโคโรฟอรบริสุทธิ์ และสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก-ไซโคโรฟอร

ปีเปิดสารละลายไซโคโรฟอร 5.00 cm^3 ลงในหลอดทดลองขนาด 15.00 cm^3 นำไปวางในตู้อบอุณหภูมิ 37°C ที่เวลาต่างๆ กันคือ 0.25, 0.50, 1.00, 3.00, 6.00, 9.00, 12.00, 15.00, 18.00, 21.00 และ 24.00 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง และสมณ λ_{max} โดยใช้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.7.2 ได้ผลดังตารางที่ 4.15, 4.16 และรูปที่ 4.13, 4.14 ตามลำดับ

3.8 การประยุกต์ของไซเคอโรฟอรในการหาปริมาณของเหล็ก

3.8.1 การเตรียมสารละลาย

ก. เก็บน้ำตัวอย่างจากบึงสีฐาน มา centrifuge แล้วปรับ pH ให้น้อยกว่า 2 โดยเติมกรด HNO_3 เข้มข้น

ข. เตรียมสารละลายของ Fe^{3+} 200.00 ppm

ชั่งเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.4040 g ละลายในน้ำกลั่น 50.00 cm^3 แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20.00 cm^3 คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตเข้มข้น 0.10 N ทีละหยด จนกระทั่งปรากฏสีชมพูอ่อนอย่างถาวร จากนั้นนำมาปรับปริมาตรในขวดปริมาตรขนาด 1.00 L ด้วยน้ำปราศจากไอออน เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา

ค. สารละลายมาตรฐานเหล็กเข้มข้น 10.00 ppm

เปิดสารละลายมาตรฐานของเหล็กเข้มข้น 200.00 ppm มาจำนวน 5.00 cm^3 ลงในขวดปริมาตรขนาด 100.00 cm^3 เจือจางและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน เป็น 100.00 cm^3 ด้วยน้ำปราศจากไอออน เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

ง. สารละลายซिटริก แอซิด บัฟเฟอร์ pH 5.00

โดยเตรียมได้ดังต่อไปนี้ คือ

สาร A: ชั่ง กรดซिटริก 53.00 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดวัดปริมาตรขนาด 500.00 cm^3

สาร B ชั่ง ไคโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 89.00 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดวัดปริมาตรขนาด 250.00 cm^3

นำสารละลาย A ผสมกับสารละลาย B ในอัตราส่วน 49 : 51 V/V

จ. สารละลายของไซเคอโรฟอร 200.00 ppm

ชั่งไซเคอโรฟอร 0.2013 g ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1.00 L ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.8.2 การศึกษา percent recovery (%R)

ก. การเตรียมน้ำตัวอย่าง(artificial samples)

เตรียมน้ำตัวอย่าง 3 ชุด ให้แต่ละชุดมีความเข้มข้นของเหล็กเป็น 0.10, 0.50 และ 0.90 ppm โดยเปิดสารละลายมาตรฐานเหล็กปริมาตร 0.25, 1.25 และ 2.25 cm^3 ตามลำดับจากสต็อกของสารละลายมาตรฐาน 10.00 ppm

ข. วิธีทดลอง

1. ปิเปตสารละลายของไฮเดรโอโรฟอร์ 12.50 cm^3 จากสต็อก 200.00 ppm และปิเปตสารละลายซिटริก แอซิด บัฟเฟอร์ ($\text{pH } 5.00$) จำนวน 2.00 cm^3 ใช้ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานของเหล็กต่างกันเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเหล็กเป็น $0.10, 0.30, 0.50, 0.70, 0.90$ และ 1.00 ppm ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25.00 cm^3 ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จนครบเขย่า และตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $\lambda_{\text{max}} 400\text{ nm}$ ได้ผลดังตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.15

2. ปิเปตน้ำตัวอย่างปริมาตรต่างๆ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25.00 cm^3 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเหล็กเป็น $0.10, 0.50, 0.90\text{ ppm}$ ในชุดที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ เติมสารละลายไฮเดรโอโรฟอร์จำนวน 12.50 cm^3 แล้วเติมซिटริก แอซิด บัฟเฟอร์ ($\text{pH } 5.00$) จำนวน 2.00 cm^3 ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน เขย่าให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm

3. ปิเปตสารละลายมาตรฐานเหล็กลงในหลอดที่ 4, 5 และ 6 ของแต่ละชุดให้มีความเข้มข้นเป็น 0.50 ppm และทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2. ได้ผลดังตารางที่ 4.18, 4.19, 4.20

3.8.3 การวิเคราะห์หาปริมาณของเหล็กด้วยไฮเดรโอโรฟอร์โดยวิธีสร้างกราฟมาตรฐาน

ปิเปตสารละลายของไฮเดรโอโรฟอร์ 12.50 cm^3 จากสต็อก 200.00 ppm และปิเปตสารละลายซिटริก แอซิด บัฟเฟอร์ ($\text{pH } 5.00$) จำนวน 2.00 cm^3 ใช้ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานของเหล็กต่างกันเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเหล็กเป็น $0.10, 0.30, 0.50, 0.70, 0.90$ และ 1.00 ppm ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25.00 cm^3 ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จนครบ เขย่า และตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $\lambda_{\text{max}} 400\text{ nm}$ ได้ผลดังตารางที่ 4.21 และรูปที่ 4.16

การวิเคราะห์น้ำตัวอย่าง

ปิเปตน้ำตัวอย่างมา 1.00 cm^3 ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25.00 cm^3 เติมสารละลายไฮเดรโอโรฟอร์ 12.50 cm^3 แล้วเติมซिटริก แอซิด บัฟเฟอร์ ($\text{pH } 5.00$) 2.00 cm^3 ปรับปริมาตรให้ครบ 25.00 cm^3 ด้วยน้ำปราศจากไอออน เขย่าให้ทำปฏิกิริยากันอย่างสมบูรณ์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 400 nm แล้วนำผลที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 4.16) ได้ผลดังตารางที่ 4.22

ปิเปตน้ำตัวอย่างมา 5.00 และ 10.00 cm^3 แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างต้น

3.9 การศึกษาการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนเหล็ก-ฟีนานโทรลีน และการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กโดยวิธีฟีนานโทรลีน

3.9.1 การเตรียมสารละลาย

ก. สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตต บัฟเฟอร์ (pH 4.00) เข้มข้น 29.00 % w/v
ละลายแอมโมเนียมอะซิเตต 250.00 g ในน้ำปราศจากไอออน 150.00 cm³ เดิมกรดอะซิติก เข้มข้น 700.00 cm³ เขย่าให้สารละลายผสมกัน

ข. สารละลายไฮดรอกซีลามีन

ละลายไฮดรอกซีลามีน ไฮโดรคลอไรด์ 10.00 g ในน้ำปราศจากไอออน 100.00 cm³

ค. สารละลายฟีนานโทรลีน

ละลาย 1.10-ฟีนานโทรลีน โมโนไฮเดรต 0.2566 g ในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100.00 cm³ เดิมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 หยด และต้มสารละลายให้ร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C อย่างให้เดือด

3.9.2 วิธีการทดลอง

เปิดสารละลายมาตรฐานเหล็ก ในปริมาตรต่างๆ กันเพื่อให้มีปริมาณของเหล็กอยู่ในช่วง 0.10 ถึง 1.00 ppm ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125.00 cm³ เติมน้ำให้มีปริมาตร 50.00 cm³ ด้วยน้ำปราศจากไอออน เดิมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2.00 cm³ และสารละลายไฮดรอกซีลามีน 1.00 cm³ เติมน้ำอีก 2-3 ช้อน ต้มสารละลายให้เดือดเพื่อให้แน่ใจว่าเหล็กในน้ำละลายหมด ต้มต่อไปจนกระทั่งปริมาตรลดลงเหลือประมาณ 15-20 cm³ ตั้งสารละลายให้เย็นลง ณ อุณหภูมิห้อง และถ่ายสารละลายลงในขวดปริมาตรขนาด 50.00 cm³ เดิมสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตต บัฟเฟอร์ 10.00 cm³ และสารละลายฟีนานโทรลีน 4.00 cm³ เติมน้ำปราศจากไอออนให้ถึงขีดปริมาตร ตั้งสารละลายไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์นาน 5 ถึง 10 นาที

เลือกสารละลายมาตรฐานเหล็กที่มีความเข้มข้น 3.00 ppm วัด Absorption spectrum ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อหาค่า λ_{max} ของสารละลาย ได้ผลดังรูปที่ 4.17 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่ง λ_{max} 510 nm ที่ได้จากการทดลองใช้สารละลายแบบดังที่ทดลองเหมือนข้างต้นแต่ไม่มีสารละลายมาตรฐานของเหล็กเป็น Reference เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของเหล็ก ได้ผลดังตารางที่ 4.23 และรูปที่ 4.18

สภาวะที่ใช้	
λ_{range}	= 600-350 nm
Scan speeds	= 120 nm/min
Chart format	= 20 nm/cm
Slit Width	= 2 nm
Scale	= 0.00 - 1.00

3.9.3 การวิเคราะห์เหล็ก(III)ในน้ำตัวอย่าง ด้วยวิธีฟิแนนโรลีน

ก. นำน้ำตัวอย่างมาวิเคราะห์ คือ น้ำจากบึงสีฐาน

ข. ปิ่บน้ำตัวอย่าง 50.00 cm³ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 125.00 cm³ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2.00 cm³ และสารละลายไฮดรอกซีลามีน 1.00 cm³ เติมเม็ดแก้ว 2-3 ชิ้น ต้มสารละลายให้เดือดเพื่อให้แน่ใจว่าเหล็กในน้ำละลายหมด ต้มต่อไปจนกระทั่งปริมาตรลดลงเหลือประมาณ 15-20 cm³ ตั้งสารละลายให้เย็นลง ณ อุณหภูมิห้อง และถ่ายสารละลายลงในขวดปริมาตรขนาด 50.00 cm³ เติมสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตด บัฟเฟอร์ (pH 4.00) จำนวน 10.00 cm³ และสารละลายฟิแนนโรลีน 4.00 cm³ เขียวางสารละลายให้ถึงขีดปริมาตร ตั้งสารละลายไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ประมาณ 5 ถึง 10 นาที

ค. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} 510 nm แล้วนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานรูปที่ 4.18 จะทำให้ทราบปริมาณของเหล็กในน้ำตัวอย่างนั้น แสดงผลที่ได้ในตารางที่ 4.24