

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 สารเคมี

- กรดอะซิติก (Acetic acid, CH_3COOH) AR, grade, BDH Chemical Ltd.
- แอมโมเนียมเพอร์ริกซัลเฟต (Ammonium ferric sulfate, $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$) AR. grade, Fluka Gatanite.
- คลอโรฟอร์ม (Chloroform, CHCl_3) AR. grade, May & Baker Ltd.
- ไอรอน(III)ไนเตรทนาโนไฮเดรต (Iron(III)nitrate nanohydrate, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) AR. grade, Riedel-Dehaen Ltd.
- อีเทอร์ [Ether, $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$] AR. grade, J.T. Baker Inc.
- เมทานอล (Methanol, CH_3OH) HPLC grade, J.T. Baker Inc.
- ฟีนอล (Phenol, $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) AR. grade, Farmitalia Carlo Erba.
- ไพริดีน (Pyridine, $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_2)(\text{C}_2\text{H}_2)\text{CH}$) AR. grade, Farmitalia Carlo Erba.
- โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) Ar. grade, Farmitalia Carlo Erba.

2.2 เครื่องแก้ว

- บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100, 250, 500, 1000 และ 2000 ml
- กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 10 และ 100 ml
- ขวดรูปชมพู่ (Erlenmayer flask) ขนาด 100 และ 500 ml
- กรวยกรอง (Funnel)
- กระจกนาฬิกา (Glass watch)
- ปิเปต (Pipet) ขนาด 1 ml

- กรวยแยก (Separation funnel) ขนาด 1,000 ml
- แท่งแก้วคน (Stirring rod)
- หลอดทดลอง (Test tube)
- ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 100 และ 1,000 ml

2.3 เครื่องมือ

- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
H-11N Series, Kokusan Enshinki Co. Ltd. 8 ช่องใส่หลอดทดลอง,
สเกลสปีดสูงสุด 12 ความถี่สูงสุด 6,000 รอบ/นาที

- เครื่องชั่งของ Sartorius
รุ่น A 200 S ความละเอียดวัดได้ทศนิยมตำแหน่งที่ 4

- คอลัมน์ K 9 (Column K 9)
คอลัมน์ชนิดอะครีลิก พลาสติก (acrylic plastic) ขนาด 0.9x60 cm (เส้นผ่าน
ศูนย์กลาง (i.d.) ขาว), Pharmacia laboratory separation division

- เครื่องกำจัดแก๊ส (Ultrasonic cleaner)
Branson B-220, Smithkline company

- ปั๊มเพอริสแตลติก (Peristaltic pump)
ของ บริษัท Pharmacia จำกัด

- เครื่อง HPLC
งานวิจัยนี้ใช้เครื่อง HPLC ของ Waters Associates, Inc ซึ่งรายละเอียดและ
สมบัติแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงรายละเอียดสภาวะของการใช้เครื่อง HPLC

รายละเอียด	สมบัติ
-Waters Associates Chromato- graphy Pump, Model 6000 A Solvent delivery system	-ความดันสูงสุด 0-6,000 psi
-Column	-ขนาด 1.5x30 cm (i.d.xlength) C ₁₈ (Packing material)
-Detector Model 440 Absorbance Detector	-ความยาวคลื่น (λ) 254 nm sense 0.005-2.000
-Omniscrite Recorder Model Series D1 0117-161	-สำหรับอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet, UV) กระจก Kobayashi Kisokushi No. 2516 pso

2.4 การเตรียมสารละลาย

2.4.1 สารผสม Phenol/Chloroform, 1:1 (w/v)

ซังฟีนอล 500 g และดวงคลอโรฟอร์ม 500 ml เทผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน

2.4.2 สารละลาย 0.15 M acetic acid, 100 ml

ปิเปต 99.8% กรดอะซิติก ประมาณ 0.86 ml ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด
100 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2.4.3 สารละลาย 1% acetic acid, 100 ml

ดวง 99.8% กรดอะซิติก ปริมาตร 1 ml เทผสมในน้ำกลั่น 100 ml

2.4.4 สารละลาย 0.01 M Pyridine ใน Acetic acid (pH 5), 1,000 ml

ปิเปต 99.5% pyridine ประมาณ 0.800 ml ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 ml เติมน้ำกลั่นในบีกเกอร์ประมาณ 950 ml ปรับ pH เป็น 6.0 ด้วย 1% acetic acid ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 ml

2.4.5 สารละลาย 15 mM Acetate buffer, pH 6.0, 1,000 ml

ซึ่ง sodium acetate 1.23 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 ml เติมน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์ประมาณ 950 ml ปรับ pH 6.0 ด้วย 1% acetic acid และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 ml

2.4.6 สารละลาย Methanol : Acetate buffer (10:90), 2,000 ml

ตวง methanol ที่กรองแล้ว ปริมาตร 200 ml ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 2,000 ml จากนั้นตวง 15 mM acetate buffer, pH 6 ที่กรองแล้วเช่นกัน ปริมาตร 1,800 ml ผสมลงในบีกเกอร์ที่มี 15 mM acetate buffer

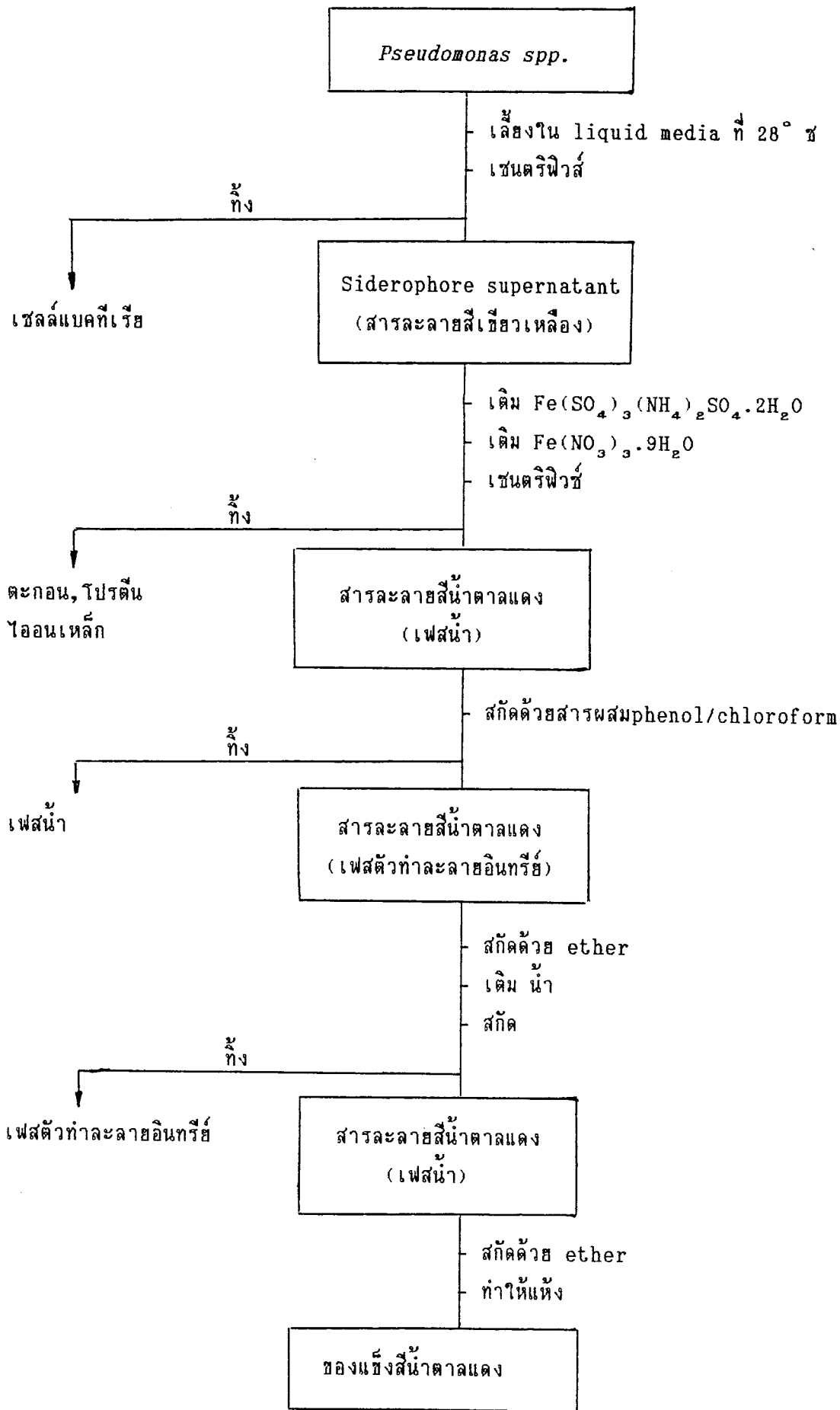
2.5 การสกัดไซโตโครพอร์

น้ำไซโตโครพอร์ที่ได้จาก *Pseudomonas* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่ปล่อยไซโตโครพอร์ออกมา เป็นสารละลายสีเขียวเหลือง ได้จากห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา ภายหลังจากแยกเซลล์ของแบคทีเรียออกไป นำมาเติม ammonium ferric sulfate และ ferric nitrate ผสมกัน หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที ประมาณ 15 นาทีเพื่อแยกตะกอนของโปรตีนออกจากสารละลาย supernatant ที่ได้จะมีสีน้ำตาล ผสมสารละลาย supernatant และสารผสม phenol/chloroform ลงในกรวยแยก แต่สกัดโดยการหมุนกรวยแยกเบา ๆ เพื่อแยกเอาสารเชิงซ้อนไซโตโครพอร์มาอยู่ในเฟสสารละลายอินทรีย์ แยกเก็บสารละลายในเฟสสารละลายอินทรีย์ที่มีสีน้ำตาลไว้ จากนั้นเทสารละลายอินทรีย์ที่สกัดได้พร้อมทั้งเติม ether ลงไปให้มีปริมาตรเป็น 2-3 เท่า ของเฟสสารละลายอินทรีย์ หลังจากนั้นเติมน้ำปริมาตรเล็กน้อย (5-10 ml) เพื่อสกัดเอาสารเชิงซ้อนของไซโตโครพอร์ให้กลับคืนมาอยู่ในเฟสของน้ำอีกครั้ง เขย่ากรวยแยกแรง ๆ เก็บชั้นสารละลายน้ำไว้ นำไปเติม ether ในกรวยแยก

โดยมีปริมาตรเท่า ๆ กัน เขย่าแรง ๆ เพื่อสกัดเอา phenol ที่ยังเหลือตกค้างอยู่
ในเศษของสารละลายน้ำออกให้หมด สารละลายที่สกัดได้นำไป Lyophilization
ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา เพื่อเก็บในรูปของของแข็ง แล้วแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเจลโครมาโท-
กราฟี ต่อไป สรุปรูปขั้นตอนการสกัดทั้งหมดดังรูปที่ 2.1

2.6 การแยกสารเชิงซ้อนไซเตอรพอร์ด้วยเทคนิคเจลโครมาโทกราฟี

หลังจากแยกสารไซเตอรพอร์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อและโปรตีนออกแล้วทำ
การแยกสารเชิงซ้อนด้วยเทคนิคเจลโครมาโทกราฟีเพื่อให้ได้ไซเตอรพอร์ที่บริสุทธิ์
มากขึ้น และเนื่องจากสารเชิงซ้อนไซเตอรพอร์ มีขนาดโมเลกุลที่ค่อนข้างใหญ่และ
มีขนาดที่แตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องแยกด้วยเทคนิค Gel chromatography การ
เตรียมคอลัมน์สามารถทำได้ดังนี้ ค่อย ๆ เท Bio-Gel P เจลแห้งลงในบีกเกอร์
ที่มีน้ำกลั่น ปล่อยให้เจลรวมตัวกับน้ำจนอิ่มตัวและไม่มีฟองอากาศบนอยู่ ทิ้งไว้ประมาณ
1 ชั่วโมง รินสารละลายน้ำออกครึ่งหนึ่งทิ้งไว้ให้เจลดอนกันต่อกรวยส่วนบนสุดของคอลัมน์
ปิดทางออกด้านล่าง เติมน้ำกลั่นให้คอลัมน์สูงประมาณ 2-3 ของความยาว เทเจล
เหลวลงในคอลัมน์โดยอย่าให้มีฟองอากาศ เมื่อเจลเหลวสูงประมาณ 2-5 เทาปล่อยให้
น้ำไหลออก อัตราการไหล 3 ml/hr เทเจลเหลวบรรจุในคอลัมน์จนเสร็จ หลังจากนั้น
equilibrate คอลัมน์ด้วย 0.01 M pyridine ใน acetic acid (pH 6.0) จากนั้นละลายสารตัวอย่างของสารเชิงซ้อนไซเตอรพอร์ที่ละลายใน
0.01 M pyridine ใน acetic acid ที่มีความเข้มข้นสูง ปริมาตร 2 ml
ป้อนสารละลายเข้าสู่คอลัมน์แล้ว จึงชะสารออกมาด้วย 0.01 M pyridine ใน
acetic acid เก็บสารตัวอย่างที่แยกออกมาเป็นช่วง ๆ จากคอลัมน์ แล้วจึงนำ
สารที่เก็บแต่ละส่วนไป lyophilization ไว้ในรูปของของแข็งเพื่อนำไปวิเคราะห์
หาความบริสุทธิ์ด้วย HPLC ต่อไป สภาวะเจลโครมาโทกราฟีที่ใช้การทดลองแสดง
ในตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.1 แสดงแผนผังสรุปวิธีการทดลอง

ตารางที่ 2.2 แสดงสภาวะของเจลโครมาโทกราฟีที่ใช้ทดลอง

รายละเอียด	สภาวะการทดลอง
Column K9	ขนาด 0.9x60 cm (i.d.xlength)
Packing material	Bio-Gel P-2 gel ขนาด 45-90 μm
Peristaltic pump	Flow rate 3 ml/hr
Solvent	0.01 M pyridine ใน acetic acid (pH 6.0)

2.7 การทดสอบความบริสุทธิ์ด้วย HPLC

หลังจากสกัดสารเชิงซ้อนไซเตอโรเฟอร์และแยกส่วนต่าง ๆ ให้บริสุทธิ์ด้วย เจลโครมาโทกราฟีแล้ว สามารถทำการศึกษาหาความบริสุทธิ์ของสารที่ได้ ด้วย เครื่อง HPLC ซึ่งมีสภาวะการทดลองของเครื่องแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงสภาวะการทดลองของเครื่อง HPLC

รายละเอียด	สภาวะการทดลอง
-Column C ₁₈	- ขนาด 1.5x30 cm (กว้าง x ยาว)
-Flow rate	- 1 ml/min
-Pressure	- 1000 psi
-ความยาวคลื่น	- 254 nm
-Sense	- 0.02
-Chart formate	- 0.25 cm/min
-Sample volume	- 10 μ l
-Mobile phase	- Methanol : Acetate buffer (10:90)

หมายเหตุ : สารละลายที่ใช้ในเครื่อง HPLC จะต้องกรองด้วยกระดาษกรองเนื้อเยื่อขนาด 0.45 μ m และผ่านการกำจัดแก๊ส (degas) ด้วยเครื่อง Ultrasonic cleaner เสมอ

ทำการ equilibrate คอลัมน์ด้วย mobile phase ประมาณ 1 hr ค่อย ๆ เพิ่ม flow rate ช้า ๆ จนกระทั่งได้ flow rate 1 ml/min นีดสารตัวอย่างซึ่งละลายด้วยเฟสเคลื่อนที่ที่นึ่งด้วย microsyringe ขนาด 25 μ l จำนวน 10 μ l ที่ injection port หลังจากวิเคราะห์สารตัวอย่างเสร็จแล้ว จะล้าง column ด้วย methanol : water (50:50) ประมาณ 1 hr และล้างให้สะอาดอีกทีด้วย methanol บริสุทธิ์ ประมาณ 1 hr