บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกเชื้อ Streptomyces ที่สร้างสารต่อต้านเชื้อราจากดินตัวอย่าง

นำดินตัวอย่างจากส่วนยางพาราภาคใต้ของประเทศไทย มาละลายและทำให้เจือจางด้วยน้ำ เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกลูโคส สตาร์ช แอสพาราจีน อการ์ (Glucose Starch Asparagine Agar, ภาคผนวกหมายเลข 2) บ่มในตู้บ่ม (New Brunswick Scientific Co.Inc., U.S.A. รุ่น G - 27) ที่ 30 องศาเซลเซียส รอจนมีโคโลนีของ Streptomyces เกิดขึ้น เทับโคโลนีเหล่านั้นด้วยแซบบรอด เดกซ์โทรส อการ์ (Sabouraud Dextrase Agar, ภาคผนวกหมายเลข 1) ที่มี Candida albicans ผสมอยู่ เชื้อ C.albicans ที่ใช้จะต้องปรับให้ได้ความขุ่น (optical density) = 0.5 เมื่อวัดความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร และใช้เชื้อผสมกับอาหารในอัตราส่วน 1 : 40 นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Miller, 1976) เลือกโคโลนีของ Streptomycesที่ทำให้เกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ต่อ C.albicans แล้วนำไปทำให้เชื้อบริสุทธิ์เพื่อทำการศึกษาต่อไป

2. การจัดหมวดหมู่ของ Streptomyces sp. CU 279

ศึกษาลักษณะการเจริญ (cultural characteristics) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) และลักษณะทางสรีระวิทยา (physiological characteristics) ของ Streptomyces sp. CU 279 ที่แยกได้จากดินตัวอย่าง โดยดำเนินการตามวิธีการของอินเตอร์เนชันแนลสเตรปโตไมซีส โปรเจค (Shirling, E.B. 1966) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ คือ

- ซาเพค อการ์ (Czapeak agar, ภาคผนวกหมายเลข 3)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ซอลท์ โทเรอแรนท์ อการ์ (Salt Tolerance agar, ภาคผนวกหมายเลข 4)

- สตาร์ช อการ์ (Starch agar, ภาคผนวกหมายเลข 5)

- ยีสต์เอกซแทรก - มอลท์เอกซแทรก อการ์ (Yeast-extract - Malt - extract agar, ภาคผนวกหมายเลข 6)

- โอทมิลล์ อการ์ (Oat meal agar, ภาคผนวกหมายเลข 7)

- อินออร์แกนนิก ซอลท์สตาร์ช อการ์ (Inorganic Salt Starch agar, ภาคผนวกหมายเลข 8)

- กลีเซอรอล แอสพาราจีน อการ์ (Glycerol Asparagine agar, ภาคผนวกหมายเลข 9)

- เปปโตนยีสต์เอกซแทรก ไอร์ออน อการ์ (Peptone Yeast-extract Iron agar, ภาคผนวกหมายเลข 10)

- ไทโรซีน อการ์ (Tyrosine agar, ภาคผนวกหมายเลข 11)

- ทริปโตน-ยีสต์ เอกซแทรกบรอท (Tryptone Yeast-extract broth, ภาคผนวกหมายเลข 15)

- ลิทมัสมิลค์ (Litmus milk, ภาคผนวกหมายเลข 16)

- นิวเทรียนท์ เจลาติน (Nutrient Gelatin, ภาคผนวกหมายเลข 17)

- ไนเตรทบรอท (Nitrate broth, ภาคผนวกหมายเลข 18)

- เบซอลมินเนอรอล ซอลท์ สตาร์ช อการ์ (Basal Mineral Salt Starch agar, ภาคผนวกหมายเลข 13) ที่เติมน้ำตาล (เกรดวิเคราะห์) ชนิดต่าง ๆ คือ ดี-กลูโคส (D-glucose), ดี-ฟรุคโทส (D-fructose), ดี-ไซโลส (D-Xylose), แอล-อราบิโนส (L-arabinose), ดี-กาแลคโทส (D-galactose), ดี-แมนนิทอล (D-manitol), ซูโครส (Sucrose), แอล-แรมโนส (L-arammose), ซัลลิซิน (salicin), แรฟฟิโนส (raffinose) และ ไอ-อินโนซิทอล 1% (I-inositol)

นอกจากนี้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทัศน์ (Olympus, Japan) และศึกษาลักษณะผิวของสปอร์ (spore surface) โดยกล้องจุลทัศน์แบบอิเลคตรอน (Scanning

Electron Microscope, Hitachi, รุ่น S - 430, Japan) โดยบ่มเชื้อที่ 30 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน แล้วจัดหมวดหมู่ของเชื้อ Streptomyces sp. CU 279 จากลักษณะที่ศึกษาโดยวิธีการที่กล่าวมาแล้วโดยจัดตามหลักของ Bergey (Buchanan, 1974)

3. การสกัดสารต่อต้านเชื้อราออกจากเซลของ Streptomyces sp. CU 279

เชื้อ Streptomyces sp. CU 279 ซึ่งเก็บรักษา (stock culture) ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อผิวหน้าเอียง (slant) ชนิดอินออร์แกนนิกซอลท์ สตาร์ช อการ์ (ภาคผนวก หมายเลข 5) ได้ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ซึ่งมีส่วนผสมดังสูตรอาหารหมายเลข 21) ในภาคผนวก ซึ่งมีอาหาร 50 ม.ล. บรรจุอยู่ในขวดเลี้ยงเชื้อ (flask) ขนาดบรรจุ 250 ม.ล. นำมาเขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (New Brunswick Scientific Co.Inc., U.S.A. รุ่น G - 27) ที่ 30 องศาเซลเซียส โดยเขย่า 250 รอบ/นาที เชื้อจะสร้างสารต่อต้านเชื้อราและสะสมอยู่ในเซล หลังจากเลี้ยงเชื้อได้นาน 120 - 140 ชั่วโมง ได้นำเซลมาสกัดเอาสารต่อต้านเชื้อราออกโดยใช้ 80% เมทานอล (methanol) ในน้ำตามขั้นตอนต่อไปนี้

เซลของ Streptomyces sp. CU 279

↓

ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง

↓

สกัดด้วย 80% เมธานอลในน้ำบนเครื่องเขย่า (New Brunswick Scientific Co.Inc., U.S.A. รุ่น G - 10) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส, เขย่า 300 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

↓

กรองเอากากเซลทิ้ง

↓

ทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สภาวะสูญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator ของ Tokyo Rikakikai Co.LTD.)

↓

สารต่อต้านเชื้อราลักษณะเป็นผงสีเหลืองเข้ม

4. การทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อต้านเชื้อราโดยวิธีไบโอแอสเซย์ (Bioassay)

เตรียมเปเปอร์ดิส (Paper disc) ที่ชุบสารต่อต้านเชื้อรา โดยจุ่มเปเปอร์ดิส (8.0 x 0.8 ม.ม. , Tokyo Filter Paper Co.LTD.) ลงในสารละลายของสารต่อต้านเชื้อราที่ละลายอยู่ในเมทธานอล ปล่อยให้เมทธานอลแห้งแล้วทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อต้านเชื้อรา โดยวางเปเปอร์ดิสที่เตรียมไว้ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอาหารชนิดแข็งบนรอดเดกซโทรส อการ์ (Sabouraud Dextrose agar, ภาคผนวกหมายเลข 1) ที่ผสมเชื้อ C.albicans. นำจานเลี้ยงเชื้อนั้นไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง แล้ววัดความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น

5. การกำหนดหน่วยวัดปริมาณสารต่อต้านเชื้อรา

ใช้วิธีไบโอแอสเซย์หาประสิทธิภาพของสารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตขึ้นโดย Streptomyces sp. CU 279 ตามวิธีในข้อ 4 โดยใช้สารต่อต้านเชื้อราที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จากนั้นวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่สารนี้ยังยั้งการเจริญของ C. albicans หรือที่เรียกว่าบริเวณยับยั้ง โดยกำหนดว่าปริมาณสารต่อต้านเชื้อราที่ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.3 ซ.ม. เป็นปริมาณสาร 1 หน่วย ซึ่งจะใช้เป็นหน่วยในการบอกปริมาณสารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตขึ้นตลอดการวิจัยครั้งนี้

6. การหาสารแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตสารต่อต้านเชื้อรา

6.1 การหาสารแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เลี้ยง Streptomyces sp. CU 279 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรหมายเลข 20 (ภาคผนวกหมายเลข 20) เพื่อเป็นหัวเชื้อ (Starter) บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (New Brunswick Scientific. Co.Inc., U.S.A. รุ่น G-27) ที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 250 รอบ/นาที จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรหมายเลข 14 (ภาคผนวกหมายเลข 14) แต่ใช้สารแหล่งคาร์บอนต่างกันไปดังต่อไปนี้คือ

ก. แป้งมันสำปะหลัง (โรงงานไทยเรือง) 2%

ข. แป้งมันฝรั่ง (Difco Laboratory, U.S.A.) 2%

ค. แป้งชนิดละลายน้ำ (soluble starch, Fulka, Switzerland) 2%

บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (New Brunswick Scientific Co.Inc., U.S.A. รุ่น G-27) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 250 รอบ/นาที เก็บเซลมาสกัดและหาปริมาณสารต่อต้านเชื้อราที่สร้างขึ้นในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน โดยวิธีไบโอแอสเซย์ กับ C.albicans นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารโดยเทียบว่าสารที่มีค่า เท่ากับ 1 หน่วย คือ ปริมาณสารต่อต้านเชื้อราที่ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งต่อ C.albicans มีเส้นผ่าศูนย์กลาง = 1.3 ซ.ม. ดังได้แสดงไว้ในข้อที่ 5

6.2 การหาสารแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ดำเนินการทดลองเหมือนกับการหาสารแหล่งคาร์บอนทุกประการ โดยเลี้ยง Streptomyces sp. CU 279 ในอาหารสูตรหมายเลข 19 (ภาคผนวกหมายเลข 19) ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2% เป็นสารแหล่งคาร์บอน แต่ใช้สารแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ดังต่อไปนี้คือ

ก. โพลีเปปโตน (Polypeptone, Difco. Co.LTD.) 1%

ข. กากถั่วเหลืองจากประเทศไทย (สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กทม.) 1%

ค. กากถั่วเหลืองจากประเทศญี่ปุ่น 1%

ง. คอร์นสตีปลิเคอร์ (Corn Steep Liquour) 1%

หาปริมาณสารต่อต้านเชื้อราที่สร้างขึ้นตามวิธีเดียวกับข้อ 6.1

7. ผลของน้ำตาลมัลโทส (maltose) ที่มีต่อการผลิตสารต่อต้านเชื้อรา

7.1 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในเวลาต่าง ๆ กันของการเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp. CU 279 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรหมายเลข 21 (ภาคผนวกหมายเลข 21) เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนน้ำใส (culture filtrate) มาทำการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่โดยใช้วิธีเบินฟิลด์ (Bernfeld's method; Burnfeld, 1955) เทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลมัลโทสซึ่งได้มาจากวิธีการหาเดียวกัน โดยเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อมาทดสอบหาปริมาณน้ำตาลทุก ๆ 24 ชั่วโมง เริ่มตั้งแต่เพาะเชื้อวันแรกและเก็บตัวอย่างต่อไปจนกระทั่งถึงเมื่อมีอายุได้ 288 ชั่วโมง (12 วัน)

7.2 ศึกษาผลของน้ำตาลมัลโทสที่มีต่อการผลิตสารต่อต้านเชื้อรา

เลี้ยง Streptomyces sp. CU 279 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 21 (ภาคผนวกหมายเลข 21) โดยบรรจุอาหารประมาณ 50 มล. ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 250 มล. แล้วแยกออกเป็น 2 ชุด บ่มขวดเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 250 รอบ/นาที หลังจาก 48 ชั่วโมง เติมสารละลายน้ำตาลมัลโทสลงไปในขวดเลี้ยงเชื้อชุดที่ 1 อีก 0.64% จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อต่อไป ส่วนชุดที่ 2 เติมสารละลายน้ำตาลมัลโทสลงไปอีกในความเข้มข้นเท่ากันกับชุดที่หนึ่งหลังจากเลี้ยงเชื้อไปได้ 72 ชั่วโมง เลี้ยงเชื้อต่อไป ต่อจากนั้นเก็บเซลในช่วงเวลาต่าง ๆ กันคือ 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 และ 264 ชั่วโมง นำเซลที่เก็บได้มาสกัดและหาปริมาณของสารโดยวิธีไบโอแอสเซย์ แล้วเปรียบเทียบกับปริมาณสารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยไม่เติมน้ำตาลมัลโทส

18. ประสิทธิภาพการต่อต้านเชื้อราของสารที่ผลิตขึ้น

18.1 การหาประสิทธิภาพของสารในการยับยั้งการเจริญของราและยีสต์ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

18.1 ก เตรียมเชื้อทดสอบ (test organism) ชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งบนรอด เดกซ์โทรส อการ์ (sabouraud dextrose agar, ภาคผนวกหมายเลข 1) ที่ผิวหน้าเอียง (slant) ให้มีอายุประมาณ 4 วัน เชื้อทดสอบที่ใช้มีรายชื่อดังต่อไปนี้คือ

ยีสต์ Saccharomyces cerevisiae TISTR

Candida albicans

Candida tropicalis

Candida utilis ARCT Y. 46

Hansenula anomala DMDU Y - 4

Endomycopsis fibuligera TISTR 5033

แบคทีเรีย Bacillus subtilis

Serratia marcescens

Escherichia coli

รา Fusarium moniliform UPCC 3713

Aspergillus oryzae TISTR 3014

Aspergillus niger (Kyushu)

Rhizopus sp. TISTR

Trichoderma viridae TISTR 3162

Penicillium sp. TISTR

Acrocylindrium oryzae (Botany)

Helminthosporium oryzae (Botany)

Mucor racemosus ARCT # M - 20

Curvularia lunata TISTR 3068

Pericularia oryzae (Botany)

8.1. ข ใช้วิธีเพลทไดลูชัน (Plate Dilution Method) ในการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อตามที่แสดงไว้ในข้อ 8.1.ก โดยผสมสารต่อต้านเชื้อราลงในอาหารชนิดแข็งบรอด เดกซ์โทรส อการ์ (ภาคผนวกหมายเลข 1) ให้ได้ความเข้มข้นของสารต่าง ๆ กันจากนั้นเพาะเชื้อทดสอบดังกล่าวข้างต้นลงบนผิวหน้าของอาหารดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, 24 - 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อทดสอบบนจานเลี้ยงเชื้อ (Lechevalier, 1961)

8.2 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการแพร่กระจายของโรครวงข้าวเน่า (Sheath rot) บนรวงข้าว

ก. เตรียมสารละลายสารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย Streptomyces sp. CU 279 ละลายสารที่เตรียมได้ตามข้อ 3 ใน 17%เมทานอลในน้ำแล้วปรับให้ได้ความเข้มข้นต่างกันคือ 100, 200, 300, 400, 600 และ 800 ส่วนในล้านส่วน (ppm.) ตามลำดับ

ข. เตรียมต้นข้าวสำหรับทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อต้านเชื้อรา

ปลูกข้าวจ้าวพันธุ์ กข. 3 ให้ได้อายุ 80 - 100 วัน (ข้าวออกรวงโผล่พ้นกาบใบธงประมาณ $\frac{1}{3}$ ของรวง) แบ่งต้นข้าวออกเป็น 2 ชุด ชุดแรกฉีดสปอร์ของเชื้อรา Acrocylindrium oryzae ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครวงข้าวเน่าที่ละลายในน้ำ (เข้มข้นประมาณ 1.92×10^9 สปอร์/ม.ล.) โดยฉีดสปอร์ต้นละ 50 ม.ล. ปล่อยทิ้งไว้ 2 วัน ก่อนนำไปใช้ทดสอบ ข้าวชุดที่สองไม่ต้องฉีดเชื้อปล่อยไว้ตามปกติ

ค. การใช้สารต่อต้านเชื้อราพ่นแก่ต้นข้าว

นำต้นข้าวชุดที่ 1 ซึ่งฉีดสปอร์ของ Acrocylindrium oryzae ได้ 2 วัน มานับจำนวนเมล็ดข้าวที่มีทั้งหมด แล้วพ่นสารต่อต้านเชื้อราที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ต้นละ 50 ม.ล. ต่อมาคิดหาเปอร์เซนต์ของเมล็ดข้าวที่เป็นโรค (เมล็ดข้าวที่เป็นโรคจะมีสีน้ำตาลเป็นจุดกระจายทั่วไป) ในระยะเวลาต่าง ๆ และทำการพ่นสารต่อต้านเชื้อราซ้ำอีกครั้งในวันที่ 7 (นับจากวันที่พ่นสารต่อต้านเชื้อราครั้งแรก) ติดตามดูเปอร์เซนต์ของเมล็ดข้าวที่เป็นโรคจนถึงวันที่ 21

นำต้นข้าวชุดที่ 2 (ยังไม่ได้ฉีดสปอร์ของเชื้อ Acrocylindrium oryzae) มาพ่นสารต่อต้านเชื้อราความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ ตามวิธีการที่ทำกับต้นข้าวชุดที่ 1 ปล่อยทิ้งไว้ 1 วัน จากนั้นทำการฉีดสปอร์ของเชื้อ Acrocylindrium oryzae ความเข้มข้นเท่ากับที่ทำกับต้นข้าวชุดที่ 1 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเมล็ดข้าวที่เป็นโรคในช่วงเวลาต่าง ๆ พ่นสารต่อต้านเชื้อราซ้ำอีกในวันที่ 7 แล้วหาเปอร์เซ็นต์ของเมล็ดข้าวที่เป็นโรคในวันที่ 14 และ 21 ตามลำดับ

หมายเหตุ เปอร์เซ็นต์เมล็ดข้าวที่เป็นโรคคำนวณได้จาก

$$\frac{\text{จำนวนเมล็ดข้าวที่เป็นโรค}}{\text{จำนวนเมล็ดข้าวที่มีอยู่ทั้งหมด}} \times 100$$

9. ความเป็นพิษต่อหนูของสารต่อต้านเชื้อรา (Toxicity)

ละลายสารต่อต้านเชื้อราที่เตรียมตามข้อ 3 ด้วย 20% เมทธานอลในน้ำให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ฉีด 0.5 ม.ล. ของสารละลายเหล่านั้นเข้าไปในช่องท้องของหนูขาว (Albino mice) ที่มีน้ำหนักตัวประมาณ 25 กรัม โดยแต่ละความเข้มข้นจะฉีดหนูเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 5 ตัว นับจำนวนหนูที่ตายและอยู่รอดภายใน 7 วัน นำผลมาคำนวณหาค่า LD_{50} (ปริมาณสารที่ทำให้หนูตาย 50%) ตามวิธีของ Reed & Muench (1938)

10. การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของสารต่อต้านเชื้อรา

การหาคุณสมบัติการดูดแสง (Spectroscopy Properties)

ละลายสารต่อต้านเชื้อราในเมทธานอลให้มีความเข้มข้น 0.01 ม.ก./ม.ล. นำไปวัดค่าการดูดแสงในช่วงแสงวิสิเบิล (ความยาวคลื่น 370 - 510 นาโนเมตร) และแสงอุลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่น 190 - 370 นาโนเมตร) โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Double Beam Spectrophotometer, รุ่น 210 - 5763, Hitachi LTD., Tokyo, Japan) ศึกษาดูความยาวคลื่นที่สารดูดแสงมากที่สุด (λ_{max}) ว่าอยู่ในตำแหน่งใดบ้าง

11. การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของสาร

11.1 ศึกษาความสามารถในการละลายของสารในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ละลายสารที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 3 ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ดังต่อไปนี้คือ

น้ำที่ปรับความเป็นกรดด่าง (pH = 2, 3, 5, 7, 9 และ 11)

เมทธานอล (Methanol)

เอทธานอล (Ethanol)

โพรพานอล (Propanol)

บิวทานอล (Butanol)

อซีโตน (Acetone)

อีเธอร์ (Ether)

เฮกเซน (Hexane)

เบนซีน (Benzene)

เอทธิล อซิเตท (Ethyl Acetate)

หาปริมาณสารที่ละลายโดยวิธีไบโอแอสเซย์กับเชื้อ C.albicans

11.2 การหาความคงตัว (stability) ของสารที่ระดับความเป็นกรดด่างต่าง ๆ ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดได้ในเมทธานอลให้เข้มข้น 0.5 ม.ก./ม.ล. นำสารละลายดังกล่าวมาปรับระดับความเป็นกรดด่างให้เป็น 2, 5, 7, 9, 12 และ 14 ตามลำดับ นำมาหาประสิทธิภาพของสารโดยวิธีไบโอแอสเซย์กับเชื้อ C.albicans เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารที่อยู่ในสารละลายที่มีระดับความเป็นกรดด่างต่าง ๆ กัน

11.3 การหาความคงตัว (stability) ของสารต่อความร้อนที่ระดับความเป็นกรดด่างต่าง ๆ

ละลายสารที่สกัดได้ในเมทธานอลให้ได้ความเข้มข้น 0.5 ม.ก./ม.ล. ปรับระดับความเป็นกรดด่างให้เป็น 2,7 และ 11 โดยใช้ HCl และ NaOH นำไปแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ

60 องศาเซลเซียส นำสารละลายเหล่านั้นมาทดสอบประสิทธิภาพทุก ๆ 30 นาที โดยการทำไบโอแอสเซย์กับ C.albicans

11.4 ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของสารโดยวิธีโครมาโตกราฟฟี (Chromatography)

11.4.1 การเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกส่วนประกอบของสารต่อต้านเชื้อราโดยวิธีทินน์แลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (Thin Layer Chromatography)

หยดสารต่อต้านเชื้อราซึ่งละลายในเมทธานอลและเข้มข้น 0.2 ม.ก./ม.ล. ลงบนแผ่นซิลิกาเจล (silica gel 60 F_{254}, E. Merck, Germany) ที่มีความหนา 0.25 ม.ม., กว้าง 1.5 ซ.ม. และยาว 16 ซ.ม. นำแต่ละแผ่นไปอบในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยสารละลายผสมโดยให้ส่วนปลายฐานของแผ่นแช่อยู่ในตัวทำละลายสูงประมาณ $\frac{3}{4}$ นิ้ว สารละลายที่ใช้มีดังนี้คือ

ก. โพรพานอล : น้ำ (8 : 2)

ข. บิวทานอลอิ่มตัวด้วยน้ำ

005632

ค. 50% อซิโตน (ในน้ำ)

ง. บิวทานอล : เมทธานอล : น้ำ (4 : 1 : 2)

จ. เมทธานอล : 20% แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ : น้ำ (20 : 1 : 4)

ฉ. บิวทานอลอิ่มตัวด้วย 0.2% กรดอซิติค

เมื่อสารละลายซึมมาถึงตำแหน่งที่ห่างจากปลายบนประมาณ 2.0 ซ.ม. นำมาทำให้แห้ง แล้วทดสอบดูสารที่ปะปน (impurity) โดยอบในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยไอของไอโอดีนแผ่นหนึ่ง ส่วนอีกแผ่นหนึ่งนำมาฉายด้วยแสงอุลตราไวโอเลต เพื่อทดสอบดูสารปะปนอีกเช่นกัน จากนั้นนำมาหาตำแหน่งของสารที่มีประสิทธิภาพต่อต้านเชื้อราโดยทำออโตไบโอกราฟ (Autobiograph) กับเชื้อ C.albicans โดยนำแผ่นซิลิกาเจลที่ผ่านกรรมวิธีโครมาโตกราฟฟีแล้วนำมาคว่ำบนอาหารชนิดแข็งบรอด เดกซ์โทรส อการ์ ที่มี C.albicans เปรียบเทียบตำแหน่งดังกล่าวกับตำแหน่งของจุดที่ปรากฏเมื่อตรวจด้วยไอโอดีนและอุลตราไวโอเลตว่ามีความสัมพันธ์กันหรือไม่

11.4.2 การใช้วิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี (column chromatography) และทินน์แลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (thin layer chromatography) ในการแยกสารเสือปนออกจากสารต่อต้านเชื้อรา

เตรียมคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 ซ.ม. ยาวประมาณ 90 ซ.ม.

↓

บรรจุคอลัมน์ด้วยซิลิกาเจล C-200 (Wako Pure Chemical Industrial LTD, Japan)

↓

หยดสารละลายของสารต่อต้านเชื้อราที่ละลายในบิวทานอล : เมทธานอล : น้ำ (4:1:2) เข้มข้นขนาด 16 ม.ก./ม.ล. ลงในคอลัมน์อย่างช้า ๆ จนได้เป็นชั้นเหนือซิลิกาเจล

↓

ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายผสมของบิวทานอล : เมทธานอล : น้ำ ในอัตราส่วน 4:1:2 อย่างช้า ๆ

↓

เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาไว้หลอดละ 3 ม.ล.

↓

นำแต่ละหลอดวัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 402 นาโนเมตร และทำไบโอแอสเซย์ กับ C.albicans

↓

ใช้สารละลายที่เก็บไว้ในแต่ละหลอดมาจุดบนแผ่นทินน์แลเยอร์โครมาโตกราฟฟี

↓ อบแผ่นทินน์แลเยอร์ในภาชนะที่อิ่มตัวด้วย บิวทานอล : เมทธานอล : น้ำ (4:1:2) (วิธี ดีเวลลอป)

พิจารณาดูลักษณะการแยกของสารในแต่ละส่วนโดยอาศัย แสงอุลตราไวโอเลตและออโตไบโอกราฟ

↓

เลือกหลอดที่เมื่อตีเวลลอปแล้วให้ส่วนที่มีประสิทธิภาพยับยั้ง C.albicans แยกจากส่วนที่ปะปนอื่น ๆ มากที่สุดมารวมกัน

↓

ทำให้เข้มข้นโดยเครื่องระเหยสารภายใต้สภาวะสูญญากาศ (Tokyo Rikakikai Co. LTD. Japan)

↓

นำมาจุดบนแผ่นซิลิกาเจล (silica gel 60 F_{254}, E. Merck, Germany) หนา 2 มม., กว้าง 20 ซ.ม. และยาว 20 ซ.ม.

↓ ตีเวลลอปในสารละลาย บิวทานอล : เมทธานอล : น้ำ (4 : 1 : 2)

ขูดเอาส่วนที่มีประสิทธิยับยั้ง C.albicans เมื่อทำไบโอแอสเซย์เทียบควบคู่กันไป

↓

ละลายสารที่ติดอยู่บนผงซิลิกาเจลด้วยเมทธานอล

↓

ทำให้เข้มข้นโดยเครื่องระเหยสารภายใต้สภาวะสูญญากาศ (Tokyo Rikakikai Co, LTD. Japan)

↓

นำมาวัดการดูดแสงในช่วงความยาวคลื่น 200 - 510 นาโนเมตร พร้อมทั้งหยดบนแผ่นซิลิกาเจล แล้วนำไปตีเวลลอปในสารละลายผสมชนิดเดิม ตรวจสอบประสิทธิภาพยับยั้ง C.albicans ควบคู่กับการตรวจสอบหาสารปะปนโดยฉายด้วยแสงอุลตราไวโอเลตว่ามีปรากฏอยู่อีกหรือไม่