บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) บริษัท Hirayama manufacturing Corporation model HA-3D

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) บริษัท RADIOMETER model PHM 83 Autocal

ตู้ลามินาร์ โฟล (Larminar Flow) บริษัท ISSCO model 25

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตรกราฟฟี (High Performance Liquid Chromatography HPLC) Shimadzu LC-3A

คอลัมน์สำหรับรูป Sep-Pak C-18 cartridge บริษัท Waters Associates

เครื่องระเหยสารภายใต้สภาวะสูญญากาศ (Rotary Vacuum evaporator) พร้อมอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) BUCHI RE III

เครื่องกรองจุลินทรีย์ (Swinnex) พร้อมกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

เครื่องอบไมโครเวฟ (Microwave Oven) บริษัท NEC model MC-300 TE

เครื่อง Peristatic pump Type SJ-1211 H บริษัท Chromatograph Alto corporation, Japan

เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก Nuova 7 stir-plate บริษัท Sybron/Tpermolyne, U.S.A

เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ Shimadzu UV-visble UV-240 บริษัท Shimadzu, Japan

เครื่องทำให้ตัวอย่างแห้ง ณ.จุดวิกฤต (Critical Point Dryer) รุ่น CPD 020 บริษัท BALZERS

กล้องจุลทรรศน์ Stereoscopic model SMZ-10 บริษัท Nikon, Japan

กล้องจุลทรรศน์ Episcopic-fluorescence บริษัท Nikon, Japan

กล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบส่องกลาด (SEM) รุ่น JSM-T20

เครื่องฉาบผิวตัวอย่างแบบ sputtering (Sputter Coater) รุ่น SCD 040 บริษัท BALZERS

2.1.2 สารเคมี

กรด 2, 4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซิติก (2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid) บริษัท Fluka

เบนซิลอะดีนีน (Benzyl adenine) บริษัท Sigma

โคเลสเตอรอล (Cholesterol) บริษัท Sigma

อะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile) ชนิด HPLC grade บริษัท E.Merck Damstadt, Germany

เมทธิลแอลกอฮอล์ (Methyl alcohol) ชนิด analytical grade บริษัท Mallinckrodt, Inc. U.S.A

เอธิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) ชนิด analytical grade บริษัท BDH, England

กรดแอลจินิก (Algenic acid) บริษัท Sigma

ทวีน 80 (Tween 80) บริษัท Sigma

ไดไพริดิล (α, α'-Dipyridyl) บริษัท E.Merck Damstadt, Germany

ไดออกเซน (Dioxan) บริษัท E.Merck Damstadt, Germany

เอธิลลีนไดอะมีนเตทตระอะซีติคแอซิค (EDTA) บริษัท Fluka

ฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท (Fluorescein diacetate) บริษัท Sigma

ผงวุ้น (Agar Powder) ห้างหุ้นส่วนจำกัด วอร์ด เมดิก

กลูตารัลดีไฮด์ 50% (Glutaraldehyde 50% solution) ชนิด EM grade บริษัท Fluka

สารเคมีอื่นๆที่ใช้นอกจากที่กล่าวนี้ เป็นสารที่อยู่ในระดับเกรดวิเคราะห์ สั่งซื้อจากบริษัท Sigma Chemicals Co. ทั้งหมด

2.2 ตัวอย่างแคลลัสพืชไข่เน่าส่วนต้น

แคลลัสส่วนต้นได้รับจาก ปัทมา ถาวรนิธิ (ปัทมา, 2533) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงมาจากส่วนของพืชไข่เน่าจากธรรมชาติ ที่ปลูกอยู่ที่ อ.บางเขน กรุงเทพมหานคร แคลลัสส่วนต้นทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS medium) (Murashige and Skoog, 1962) ครึ่งสูตร (1/2 MS) ที่เสริมด้วย auxin คือ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 1 มิลลิกรัม/ลิตร และ cytokinin คือ Benzyladenine (BA) 2 มิลลิกรัม/ลิตร ผงวุ้น 0.7 เปอร์เซนต์ ปรับ pH เท่ากับ 5.6 (ดูภาคผนวก 1) และทำการเปลี่ยนอาหารทุก 1 เดือน มาเป็นระยะเวลา 2 ปี

2.3 อาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่า

2.3.1 อาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2, 4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล ปรับ pH 5.6 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

2.3.2 อาหารเหลวสูตร B-5 (Gamborg, 1970) ทำการเตรียมอาหารแล้วเสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล ปรับ pH 5.6 (ดูภาคผนวก 2) นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.4 วิธีเตรียมสารละลายโคเลสเตอรอล (Cholesterol)

2.4.1 ละลายโคเลสเตอรอลความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในเอธิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิ 50° ซ แล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่าน millipore filter ขนาด

0.45 ไมโครเมตร จากนั้นคำนวณใส่ลงในอาหารเหลว ให้ได้ความเข้มข้นโคเลสเตอรอล 200 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาตรของเอธิลแอลกอฮอล์ที่ใส่ลงไป 0.2 เปอร์เซนต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)

2.4.2 ละลายโคเลสเตอรอล ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในตัวทำละลายอินทรีย์ไดออกเซนที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นคำนวณใส่ลงในอาหารเหลวให้ได้ความเข้มข้นโคเลสเตอรอล 200 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาตรของไดออกเซนที่ใส่ลงไป 0.2 เปอร์เซนต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)

2.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่าในอาหารเหลว

นำแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนต้น ของพืชไข่เน่าที่มีลักษณะนิ่มฟู (friable) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลวสูตร 1/2 MS (ข้อ 2.3.1) โดยใช้แคลลัสหนักประมาณ 10 กรัม ต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตร เขย่าในเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ความถี่ 80-100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นนำเซลล์ทั้งหมดมากรองผ่านแผ่นไนลอน (Nylon sereen) ขนาดความกว้างของรู 550 ไมโครเมตร เพื่อแยกกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ออกไป แล้วนำเซลล์ส่วนที่อยู่ในอาหารเหลวมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บเซลล์ที่กรองได้บนกระดาษกรองทั้งหมดไปแบ่งใส่อาหารเหลวสูตร 1/2 MS หรือ B-5 (ข้อ 2.3.2) ปริมาตร 300 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 มล. เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ความถี่ 80-100 รอบต่อนาที ให้แสงสว่าง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ $25\pm2^{\circ}$ ซ

2.6 การวัดการเจริญของเซลล์พืชในอาหารเหลว

2.6.1 การวัดปริมาตรของเซลล์ตกตะกอน (Packed Cell Volume, PCV) ดูดเซลล์แขวนลอย 10 มล.ด้วยปิเปตปลายตัด ลงในหลอดพลาสติกปลายแหลม (Centrifuge tube) ซึ่งมีสเกลบอกปริมาตร ทำการปั่นที่ 400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที อ่านค่าปริมาตรของเซลล์ที่ตกตะกอน แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซนต์เทียบกับปริมาตรเดิม 10 มล. ซึ่งเป็น 100 เปอร์เซนต์

2.6.2 การหาค่าน้ำหนักแห้ง หลังจากบันทึกค่า PCV นำเซลล์ไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ที่ทราบน้ำหนัก โดยวิธี suction นำเซลล์บนกระดาษกรองไปอบ ในเครื่องไมโครเวฟจนมีน้ำหนักแห้งคงที่

2.7 การกระจายเซลล์เกาะกลุ่มลงในจานอาหารเพาะเลี้ยง

ดัดแปลงจากวิธีของ Bergmann (Bergmann, 1960)

นำเซลล์แขวนลอยอิสระอายุ 1 เดือน ซึ่งอยู่ในช่วง log phase มากรองผ่านแผ่นไนลอน (Nylon screen) ขนาดความกว้างของรู 110 ไมโครเมตร แล้วนำเซลล์ส่วนที่กรองผ่านผ้ากรอง ไปศึกษาจำนวนเซลล์ต่อกลุ่ม ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์เป็นหน่วยเซลล์ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยให้คำนิยามของเซลล์ยูนิตว่า

" 1 เซลล์ยูนิต คือ จำนวนเซลล์เท่าไรก็ได้ที่เกาะกันเป็น 1 กลุ่ม "

(โดยปกติจะอยู่ในช่วง 1 - 15 เซลล์/กลุ่ม)

เมื่อคำนวณความเข้มข้นของเซลล์ได้แล้ว นำไปผสมกับอาหารวุ้น (ข้อ 2.3.1) ซึ่งกำลังเหลวอุณหภูมิประมาณ 35 - 40° ซ โดยคำนวณให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของวุ้นเท่ากับ 0.7 % แล้วเทลงในจานอาหารเพาะเลี้ยงจานละ 10 มล นำไปเพาะเลี้ยงแบบคว่ำจาน เพื่อป้องกันไอน้ำเกาะที่ฝาจาน ที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2° ซ และความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์เดี่ยว และเซลล์เกาะกลุ่ม ในจานอาหารเพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุก ๆ 2 วัน หลังจากเกิดโคโลนีในจานอาหารเพาะเลี้ยงแล้ว คำนวณหาประสิทธิภาพการเกิดโคโลนีของเซลล์พืชดังนี้

$$\% \text{ Plating efficiency} = \frac{\text{Number of colonies}}{\text{Number of plating units}} \times 100$$

2.8 วิธีการตรึงเซลล์พืช (Plant cell immobilization)

ดัดแปลงจากวิธีของ Brodelius และคณะ (Brodelius และคณะ, 1979)

2.8.1 การเตรียมสารละลายอัลจิเนต

ละลายอัลจิเนต 2 กรัม ในอาหารเหลว 1/2 MS (ข้อ 2.3.1) หรือ B-5 (ข้อ 2.3.2) ซึ่งไม่มีแคลเซียมคลอไรด์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.8.2 วิธีการตริงเซลล์ (รูปที่ 4)

ผสมเซลล์พืชไข่เน่า ซึ่งอยู่ในช่วง stationary phase น้ำหนักสด 30 กรัม กับสารละลายอัลจิเนต 100 มิลลิลิตร กวนเซลล์พืชให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก หยดสารละลายเซลล์ที่ได้ผ่านปลายเข็มที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร (ควบคุมความเร็วของการหยดโดยใช้เครื่อง peristatic pump) ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มี 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ 250 มิลลิลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็กตลอดเวลา สารผสมของเซลล์และอัลจิเนต เมื่อสัมผัสถูกสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ก็จะแข็งตัวเป็นเม็ดกลม เซลล์ตริงที่ได้นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์ โดยแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. ขวดละ 300 เม็ดต่ออาหารเหลว 20 มล.

2.9 วิธีวัด strength ของเม็ดเจลเซลล์ตริง

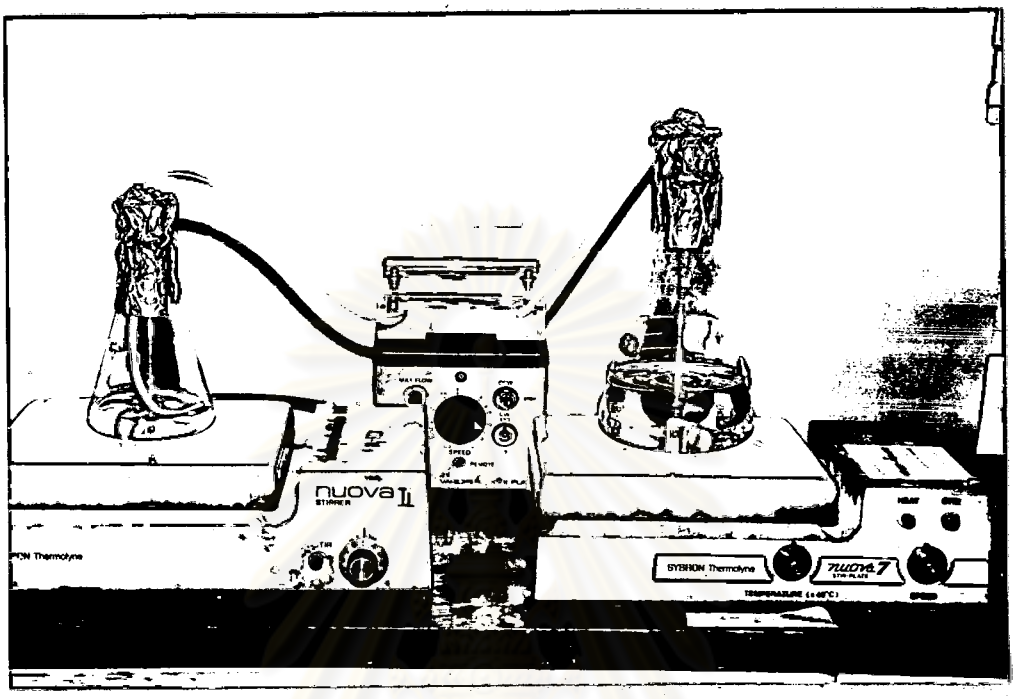
ดัดแปลงจากวิธีของ จันทร์เพ็ญ เตชะอำไพ (จันทร์เพ็ญ, 2529)

2.9.1 ลักษณะและส่วนประกอบของเครื่องมือที่ประดิษฐ์ขึ้นวัด strength ของเม็ดเจล

มีลักษณะคล้ายตาชั่งแขนเดี่ยวแบบสปริง ประกอบด้วยโลหะ 2 ส่วนที่สำคัญ คือ จานชั่ง ซึ่งเชื่อมต่อกับแท่งโลหะทรงกระบอกตัน (เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.3 เซนติเมตร และความสูง 1 เซนติเมตร) ด้วยแกนโลหะ แท่งโลหะดังกล่าวสวมอยู่กับกระบอกกลวงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่าแท่งโลหะเล็กน้อย ทำให้สามารถขยับแท่งโลหะขึ้นลงได้สะดวกโดยไม่มีความฝืด (รูปที่ 5)

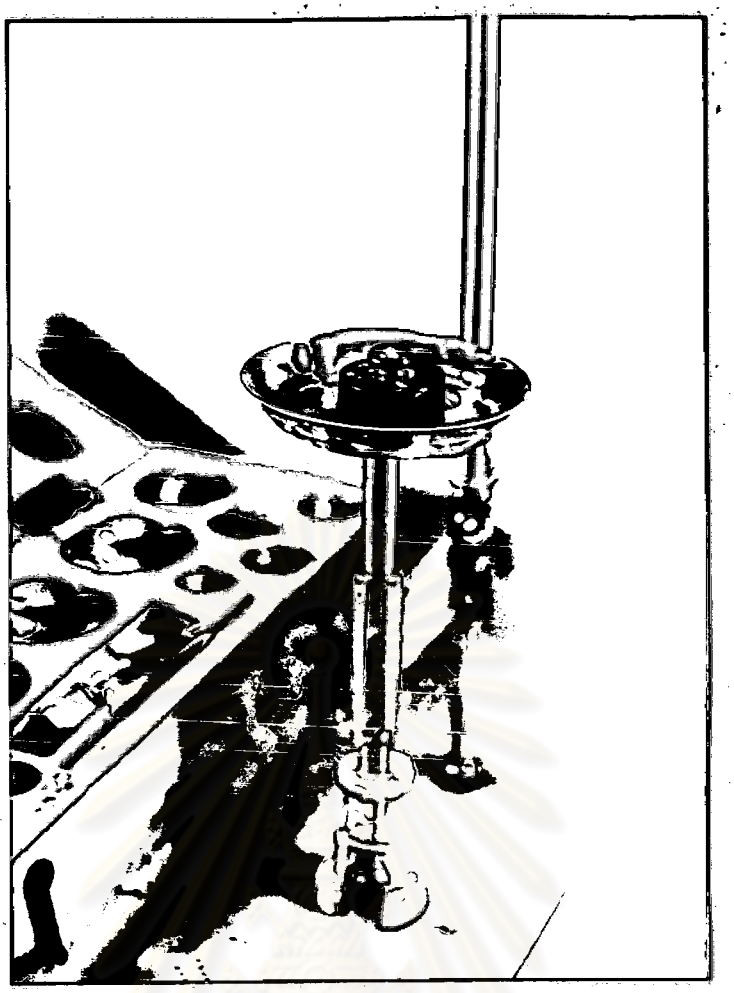
2.9.2 วิธีวัดและเปรียบเทียบ strength ของเม็ดเจล

วางเม็ดเจลบนพื้นเรียบให้อยู่ที่ศูนย์กลางของแก้วกระบอกกลวง ที่ครอบอยู่เลื่อนแท่งโลหะทรงกระบอกตันลงมาแตะกับผิวเม็ดเจล ใส่น้ำหนักบนจานชั่ง จับเวลาแต่ละครั้งเท่าๆ กัน (นาน 30 วินาที) แล้วสังเกตุการแตกของเม็ดเจล (รูปที่ 6) บันทึกน้ำหนักบนจานชั่ง

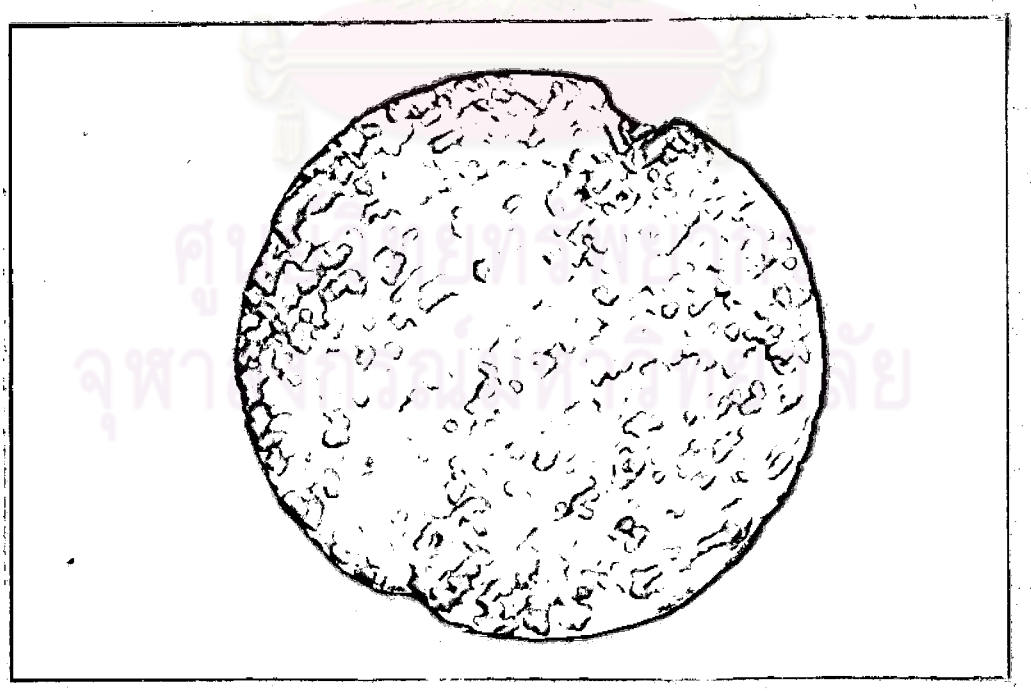


รูปที่ 4 การตริงเซลล์พืชไข่เน่า ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 เครื่องมือวัดความแข็งของเม็ดเจลเซลล์ตริง



รูปที่ 6 ลักษณะของเม็ดเจลเซลล์ตริง ที่ผ่านการวัดความแข็งแล้ว

ในการทดลองนี้ จะสุ่มตัวอย่างของเม็ดเจล ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 มิลลิเมตร อย่างน้อย 10 เม็ด ต่อค่าน้ำหนักที่อ่านแต่ละค่า

2.9.3 วิธีรายงาน strength ของเม็ดเจล

รายงานเป็นน้ำหนักต่ำสุดที่กดทับแล้วทำให้เม็ดเจลแตกปริ โดยคำนวณค่าน้ำหนักที่เติมบนจานชั่งรวมกับน้ำหนักแท่งโลหะ ต่อพื้นที่หน้าตัดแท่งโลหะในหน่วยของกิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

2.10 การละลายเม็ดเจลเพื่อปลดปล่อยเซลล์ตริงให้เป็นอิสระ

2.10.1 การเตรียมบัฟเฟอร์ละลายเม็ดเจล

โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 โมลาร์ พีเอช 7.0

ละลายไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 34.84 กรัม และโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.61 กรัม ในน้ำกลั่น 300 มล. ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ด้วยโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์

EDTA 0.1 โมลาร์

ละลายเอธิลลีนไดอะมีนเตทตระอะซิติคแอซิด (EDTA) 3.72 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล.

บัฟเฟอร์ละลายเม็ดเจล

นำ 1 โมลาร์ โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 มาผสมกับ 0.1 โมลาร์ EDTA ในอัตราส่วน 1:1

2.10.2 การละลายเม็ดเจล

ใช้บัฟเฟอร์ละลายเม็ดเจล 25 มล. ต่อเม็ดเจลเซลล์ตริง 100 เม็ด แล้วเขย่าตลอดเวลาจนเม็ดเจลละลายหมด ซึ่งใช้เวลาประมาณ 15-20 นาที

2.11 การย้อมเซลล์พืชอิสระ และเซลล์ตริงเพื่อศึกษาความมีชีวิต

ดัดแปลงจากวิธี Widholm (Widholm, 1972)

2.11.1 การเตรียมสารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท

ละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท 0..01 กรัม ในอะซีโตน 2 มล. (0.5% น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วเก็บในตู้เย็นที่ -20° ซ เวลาใช้ทำให้เจือจางโดยปิเปตสารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซิเตท 20 ไมโครลิตร แล้วทำให้เป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยอาหารเหลว สารละลายนี้เตรียมแล้วใช้ทันที

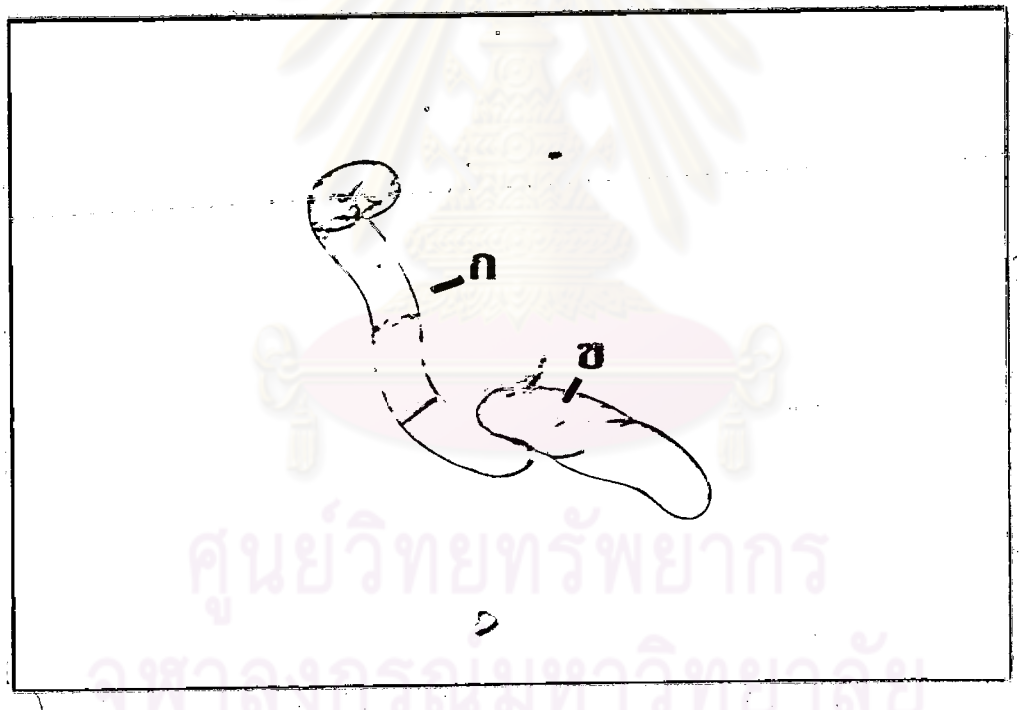
2.11.2 การย้อมเซลล์

หยดเซลล์อิสระ 1 หยด หรือ เซลล์ตริงที่หั่นเป็นชิ้นบาง ๆ แล้วจิ้งหยดสารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตทที่เจือจางแล้ว 1 หยด ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วจิ้งดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ เซลล์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เนื่องจากเซลล์มีชีวิตจะมีเอนไซม์เอสเทอเรสที่จะ deacetylate ฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท ได้เป็นฟลูออเรสเซนต์อิสระจึงเรืองแสงได้โดยตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (รูปที่ 7)

2.12 การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบส่องกราด

ใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Glauert (Glauert, 1981)

ใส่เม็ดเจลเซลล์ตริง ลงใน 2.5 % กลูตารัลดีไฮด์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ 4° ซ ล้างกลูตารัลดีไฮด์ออกด้วยสารละลายอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์พืช จำนวน 3 ครั้งติดต่อกัน (ไม่สามารถใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวล้างกลูตารัลดีไฮด์ออก เนื่องจากฟอสเฟตจะไปดึงแคลเซียมอิออน ออกจากเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งจะทำให้เม็ดเจลสลาย) แล้วนำมาดึงน้ำออกจากเม็ดเจลเซลล์ตริงด้วยเอทธานอล 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% และ 100% ขั้นตอนละอย่างน้อย 15 นาที ตามลำดับ จากนั้นทำให้ตัวอย่างแห้ง ณ.จุดวิกฤต (critical point drying) ด้วยเครื่อง critical point dryer นำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปติดบนสตับ (stub) ด้วย silver paint ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ แล้วฉาบตัวอย่างด้วยทองคำ 99 % ให้มีความหนาประมาณ 10 - 20 นาโนเมตร ด้วยเครื่องฉาบทองแบบ sputtering (Sputter Coater) นำตัวอย่างที่ฉาบทองแล้วไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) ถ่ายภาพที่ได้ประกอบการศึกษา



รูปที่ 7 แสดงความมีชีวิตของเซลล์พืชโดยการย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท

ก) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ แสดงความมีชีวิตของเซลล์ซึ่งเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

ข) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงเซลล์ตาย ซึ่งไม่เรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.13 การเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ระดับเบตา-เอคไดโซน

2.13.1 การเก็บเซลล์แขวนลอย

ทำการเก็บเซลล์ตามกำหนดเวลา โดยนำเซลล์แขวนลอยมากรอง ผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เซลล์ที่ได้บนกระดาษกรองนำไปอบแห้ง จนกระทั่งมีน้ำหนักคงที่ บันทึกค่าน้ำหนักแห้ง

2.13.2 การเก็บเซลล์ตริง

ทำการเก็บเซลล์ตริงตามกำหนดเวลา โดยนำเซลล์ตริง 300 เม็ด มาละลายด้วยบัฟเฟอร์ละลายเม็ดเจล (ข้อ 2.10.1) 100 มล. เพื่อปลดปล่อยเซลล์ตริงให้เป็นเซลล์อิสระ แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บเซลล์บนกระดาษกรองไปอบแห้งจนมีน้ำหนักคงที่ บันทึกค่าน้ำหนักแห้ง

2.13.3 การเก็บตัวอย่างส่วนที่อยู่นอกเซลล์

นำส่วนของอาหารเหลวที่เหลือจากการกรอง เอาเซลล์ออกไปแล้วทั้งหมดมาวัดปริมาตร ถ่ายใส่ขวดก้นกลม นำไปทำให้แห้งด้วย rotary vacuum evaporator

2.14 การสกัดแยกสารเบตา-เอคไดโซนจากเซลล์เพาะเลี้ยง

นำเซลล์ที่อบแห้ง ชั่งน้ำหนัก 0.2 กรัม ไปสกัดด้วย 95% เอธิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน น้ำหนักแห้ง 1.0 กรัม ต่อเอธิลแอลกอฮอล์ 50 มิลลิลิตร โดยวิธี Soxhlet เป็นเวลานาน 6 ชั่งโมง จากนั้นนำมาทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator

2.15 วิธีเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์เบตา-เอคไดโซนด้วยเทคนิค HPLC (ปัทมา, 2533)

นำสารตัวอย่างสกัดจากเซลล์หรือส่วนที่อยู่นอกเซลล์ ที่อบแห้งแล้วมาละลาย ด้วยเมทธิลแอลกอฮอล์ปริมาตร 1 มล. ทำการเขย่ากับเฮกเซนปริมาตร 2 มล. ดูดชั้นเฮกเซนทิ้ง นำส่วนที่เหลือไปอบแห้งที่ 55° ซ จากนั้นนำมาละลายน้ำกลั่น 0.5 มล. นำไปผ่านคอลัมน์

Sep-pak C-18 ทำการชะครั้งแรกด้วยสารละลาย 20 เปอร์เซนต์เมทธานอลในน้ำ และครั้งที่สองด้วย 10 มล. ของสารละลาย 80 เปอร์เซนต์เมทธานอลในน้ำ เก็บสารละลายที่ได้นำไปอบแห้งที่ 55° ซ จากนั้นนำมาละลายด้วยเมทธิลแอลกอฮอล์สมบูรณ์ปริมาตร 0.5 มล. นำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไดโซน ด้วยเทคนิค HPLC ต่อไป

2.16 <u>วิธีวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซนด้วยเทคนิค HPLC</u> (ปัทมา, 2533)

นำสารละลายจากข้อ 2.15 มาทำการวิเคราะห์ โดยการฉีดสารละลาย 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (Shimadzu LC-3A) โดยมีสภาวะ ดังนี้

Colunun size	:	25 cm * 4.6 mm I.D.
Absorbent	:	DUPONT SORBAX ODS
Injection pressure	:	300 kg/cm^2
Solvent	:	14% acetonitrile in 2% acetic acid
Flow rate	:	1 ml/min
Detector	:	UV 254 nm

โดยวิธีนี้เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของเบตา-เอคไดโซน เท่ากับ 20 นาที (ภาคผนวกที่ 3)

คำนวณค่าเบตา-เอคไดโซน จากเส้นกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 4)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย