บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. พืชทดลอง : รากแก้วของระย่อม (Rauwolfia serpentina Benth.) ที่มีลักษณะแข็งแรงไม่เป็นโรค หรือมีรอยตำหนิ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เซ็นติเมตร ขุดจากแหล่งตามธรรมชาติ 7 แห่ง ซึ่งได้รับการตรวจสอบชนิดในทางอนุกรมวิธานแล้วและได้ให้หมายเลขประจำตัวตามลำดับดังนี้

RV1 : ขุดจากบริเวณหน่วยป้องกันรักษาป่าที่ มร.4 ต.ทุ่งยาว อ.ปาย จ.แม่ฮ่องสอน

RV2 : ขุดจากบริเวณสวนลำไยของโครงการหลวงด้านงานผึ้ง อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่

RV3 : ขุดจากบริเวณน้ำตกในเขตศูนย์พัฒนาศาสนา มหาจุฬาลงกรณ์ราชวิทยาลัย ต.แคมป์สน อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์

RV4 : ขุดจากบริเวณป่าดิบแล้งตอนล่างของเขตอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า อ.นครไทย จ.พิษณุโลก

RV5 : ขุดจากบริเวณป่าสงวนเหนือเขื่อนจุฬาภรณ์ อ.เกษตรสมบูรณ์ จ.ชัยภูมิ

RV6 : ขุดจากบริเวณสวนมะพร้าวของชาวชนบท ริมถนนเพชรเกษม อ.บางสะพานใหญ่ จ.ประจวบคีรีขันธ์

RV7 : ขุดจากบริเวณเชิงเขาลักจันทร์ ต.คอนยาง อ.ปะทิว จ.ชุมพร

รากที่ขุดได้ทั้งหมด แต่ละแห่งจะแบ่งเป็น 2 ส่วนแรกเพื่อปักชำและส่วนที่สองเก็บไว้เพื่อการวิเคราะห์แอลคาลอยด์

013192

2.สารเคมี : สารเคมีที่ใช้อยู่ในเกรด Analytical reagent ส่วนใหญ่ใช้ของ Merck,Sigma และ Fluka

2.1 สารเคมีที่จำเป็นต่อการเตรียมอาหารสูตรเลี้ยงเนื้อเยื่อและกระตุ้นการสร้างแอลคาลอยด์ ใช้ตามตารางที่ 1 ซึ่งเป็นของ Merck, Damstadt

2.2 รอโวลเฟียแอลคาลอยด์มาตรฐาน 7 ชนิดคือ Ajmaline, Corynanthine, Rescinamine, Reserpine, Yohimbine (Crystalline; Sigma Chem.Co St.Soieis, Mo 67718,U.S.A),Ajmalicine (crystalline; Fluka AG Chem, Fabrick CH 9470, FR.germany) และDeserpidine(tablet 0.25 mg;Abbott Lob Ltd.,Queenborough, Kent,FR.germany)

2.3 ผง Kieselgel GF254.ART 7730(Merck,Damstadt, B.R.D,FR germany)

2.4 แผ่น TLC สำเร็จรูป Kieselgel 60F254 ,(Silicagel 60F254, precoated ART5715,Merck,Damstadt,B.R.D.,FR germany)

2.5 สารทำปฏิกิริยาให้สี(Chromogenic reagents)ได้แก่ Ammonium vanadate reagent,Ceric sulphate-sulphuric acid reagent, Ferric chloride perchloric acid reagent และ Dragendorff's reagent (ดูในภาคผนวก)

2.6 ตัวทำละลายในระบบตัวทำละลาย(solvent system) 7 ระบบคือ

2.6.1 Acetone - methanol - diethylamine

(76:20:10) (Court & Habib,1973)

2.6.2 Acetone - methanol - glacial acetic acid (70:25:5)(Court & Habib,1973)

2.6.3 Acetone-petroleum ether(b.p.40-60 C) -diethylamine (20:70:10)(Court & Habib,1973)

2.6.4 Acetone-petroleum ether(b.p.40-60 C) -glacialacetic acid (45:45:10)(Court & Habib,1973)

2.6.5 Ethylacetate - isopropanol - ammonia (85:15:5:) (Court & Habib,1978)

2.6.6 n-Butanol-glacialacetic acid - water (4:1:1) (Bolneti & Pisce,1966)

2.6.7 Methanol - methylethylketone - n - heptane (8.4:33.6:58) (Court & Habib,1973)

3. อุปกรณ์อื่นๆ และเครื่องมือ

3.1 ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อแบบธรรมดาหรือ laminar flow

3.2 เครื่องเขย่าเนื้อเยื่อ (shaker)

3.3 ชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ติดหลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิด grolux มีวงจรควบคุมการปิดเปิดไฟอัตโนมัติ

3.4 ตู้เหล็กที่สำหรับเป็นตู้มืด

3.5 ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิระหว่าง 24-26 องศาเซลเซียส

3.6 กล้องจุลทรรศน์ระบบคอมเปาด์และสเตริโอ(Olympus, Japan)

3.7 เครื่อง Shimadzu dual wavelength TLC scanner model CS 930 (Shimadzu Co.,Kyoto 604, Japan)

วิธีดำเนินการวิจัย

1 แผนดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ การเลี้ยงเนื้อเยื่อ การศึกษาการแปรหางสัณฐานวิทยาและการเจริญ การศึกษาทางพฤกษเคมีด้านการแปรของแอลคาลอยด์ซึ่งแจกแจงออกได้ตามภาพที่ 3

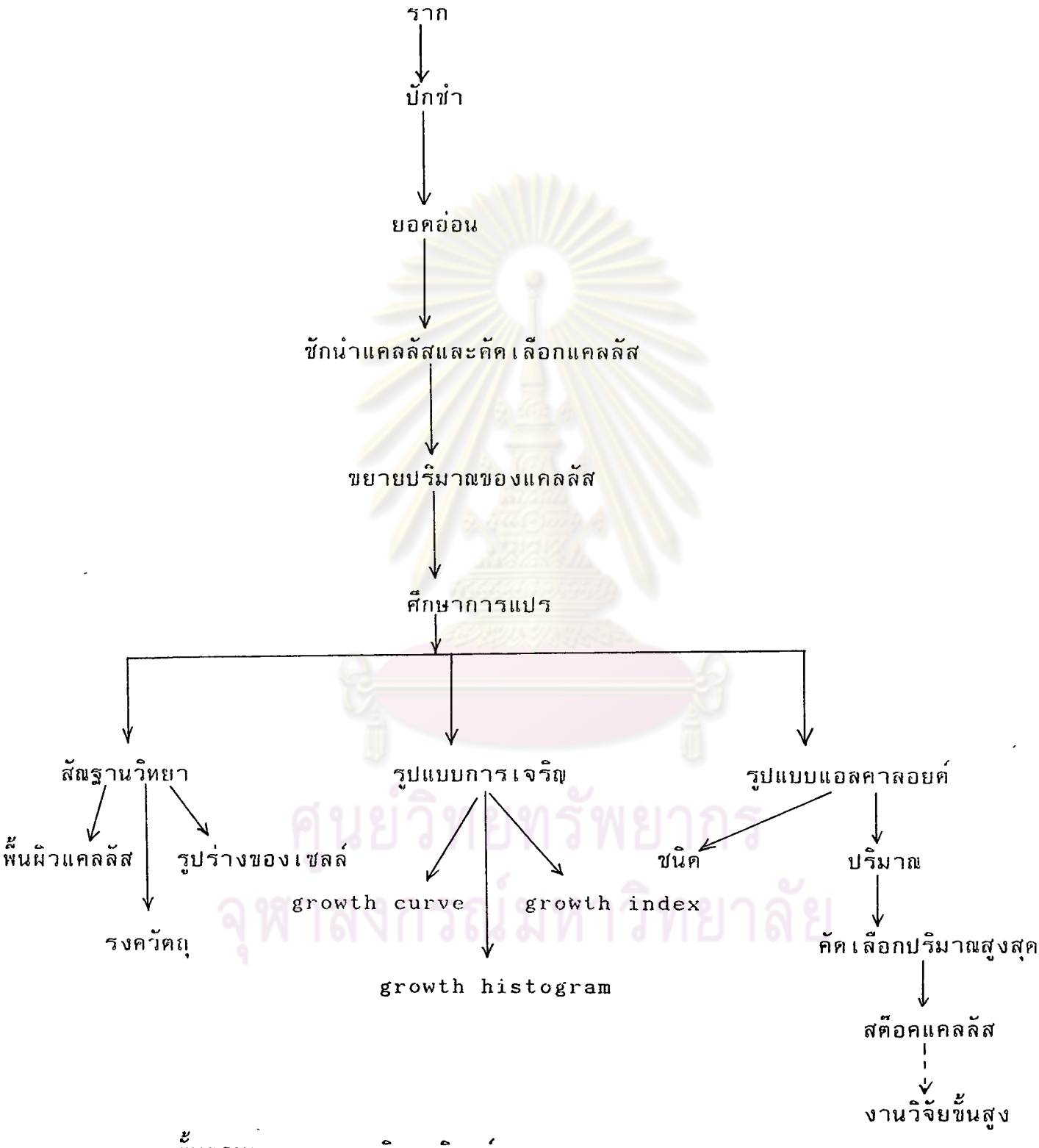
2 การปักชำท่อนราก

รากแก้วที่เก็บมาจากสถานที่ต่างๆ 7 แห่ง จะถือเป็น 7 พันธุ์แต่ละพันธุ์ใช้รากทั้งหมด 10-20 รากซึ่งขุดจากบริเวณเดียวกันในรัศมีไม่เกิน 3 เมตร มีขนาดยาวพอๆ กัน ตัดออกเป็นท่อนความยาวท่อนละ 5 ซม. ทาที่รอยตัดทั้งสองด้านด้วยยากันความชื้นและเชื้อรา,Zanta A นำลงปลูกในแนวนอนในตะกร้าพลาสติกที่มีส่วนผสมของขี้เถ้าแกลบกับทราย อัตราส่วน 1:1 ให้ท่อนรากโผล่พ้นวัสดุประมาณ 0.5 เซ็นติเมตร รดน้ำพอให้เครื่องปลูกชื้น จากนั้นวางตะกร้าเพาะภายในเรือนเพาะชำที่มีความชุ่มชื้น มีแสงแดดรำไรประมาณ 25% คอยดูแลมิให้เครื่องปลูกชื้นเกินไปเพราะจะทำให้รากเน่าได้ง่าย เมื่องอกยอดใหม่มีอายุประมาณ 2 สัปดาห์ จึงตัดไปใช้

การเก็บข้อมูล :

ศึกษาลักษณะการงอกและหาเปอร์เซ็นต์การงอกของยอดใหม่

ขั้นตอนการวิจัย



——→ = ขั้นตอนขอบเขตของวิทยานิพนธ์

- - - - - - - → = ขั้นตอนนอกเหนือจากวิทยานิพนธ์

ภาพที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

ตารางที่ 1 สูตรอาหารต่างๆ ที่ใช้ในการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัส และใช้กระตุ้นการสร้างแอลคาลอยด์

สารเคมี	Callus Induction Medium			Alkaloid Production Medium
	MSK(มก/ล)	MSO(มก/ล)	LSW(มก/ล)	AP(มก/ล)
Macronutrient				
NH_4NO_3	825	1,650	3,800	720
KNO_3	950	1,900	1,900	950
$CaCl_2.2H_2O$	220	440	400	166
$MgSO_4.7H_2O$	185	370	370	185
KH_2PO_4	85	170	170	68
Micronutrient				
$MnSO_4.4H_2O$	11.15	22.30	20.30	7
KI	0.415	0.83	0.83	0.375
$ZnSO_4.7H_2O$	4.30	8.60	8.60	-
$CoCl_2.2H_2O$	0.0125	0.025	0.025	-
H_3BO_3	3.10	6.20	6.20	2.40
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.125	0.25	0.25	-
$(NH_4)6Mo_7O_{24}$.$4H_2O$	-	-	-	0.0925
$CuSO_4.5H_2O$	0.0125	0.025	0.025	0.01
Organic constituents				
Glycine	2	2	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สารเคมี	Callus Induction Medium			Alkaloid Production Medium
	MSK(มก/ล)	MSO(มก/ล)	LSW(มก/ล)	AP(มก/ล)
L-tryptophan	-	-	-	500
Biotin	-	-	-	0.05
Folic Acid	-	-	-	0.05
Nicotinic Acid	0.50	0.50	-	5
Pyridoxein HCL	0.50	0.50	-	0.50
Thiamine HCL	0.10	0.10	0.40	0.50
IAA	-	-	-	0.18
NAA	1	-	-	-
2,4-D	-	1	0.22	-
Kinetin	1	0.50	0.22	-
BAP	-	-	-	1.13
Yeast extract	-	1,000	-	-
Sucrose	30,000	30,000	30,000	50,000
Agar.	8,000	8,000	8,000	8,000
Distilled water(มล.)	1,000	1,000	1,000	1,000

แต่ละสูตรปรับ pH ให้เป็น 5.7+1 ด้วย 1.0 N HCl หรือ 1.0 N KOH

หมายเหตุ :

MSK:Callus induction medium ตามวิธีของ Nathalang(unpublished result)

MSO: " " " " OhtaและYatazawa(1979)

LSW: " " " " Watanabeและคณะ(1982)

AP: Alkaloid production meduim ตามวิธีของ Zenk และคณะ(1977)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัยนี้เลือกใช้ตามสูตรที่มีผู้รายงานว่าทำการทดลองแล้วได้ผลต่อการเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัส ในที่นี้ใช้ 4 สูตร ได้แก่ ของ Nathalang(unpublished result),Ohta และ Yatazawa(1979) Watanabeและคณะ(1982) และ Zenk และคณะ (1977) รายละเอียดขององค์ประกอบของสูตรอาหารทั้ง 4 สูตรแจกแจงในตารางที่ 1

3.1 สูตรอาหารที่ใช้ชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัส (callus initiation and multiplication medium)

ในการชักนำและเพิ่มปริมาณใช้สูตรเดียวกันตลอด มีทั้งหมด 3 สูตร สูตรแรกเป็นสูตรดัดแปลงจากของ Murashige และ Skoog(1962) (MS) ที่ลดปริมาณธาตุหลักและธาตุรองลงครึ่งส่วนและเติม NAA กับ Kinetin อย่างละหนึ่ง มก/ล ตามวิธีของ Nathalang (unpublished result) เพื่อความสะดวกจะเรียกอาหาร สูตรนี้ว่า " MSK " สูตรที่ 2 ใช้สูตรดัดแปลงจากของ MS เช่นกันโดยเติม 2,4-D เข้มข้น 1 มก/ล Kinetin 0.5 มก/ล และ Yeast extract 0.1 ตามวิธีของ Ohta และ Yatazawa (1979) เพื่อความสะดวกจะเรียกอาหารสูตรนี้ว่า "MSO" ส่วนสูตรที่ 3 ใช้สูตรดัดแปลงจากของ Linsmaier และ Skoog (1965)โดยเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมไนเตรทเป็น 2 เท่าของโปตัสเซียมไนเตรทและเติม 2,4,-D และ kinetin อย่างละ 0.25 มก/ล ตามวิธีของ Watanabe และคณะ (1982) เพื่อความสะดวกเรียกจากการสูตรนี้ว่า " LWS "

3.2 สูตรอาหารที่ใช้กระตุ้นการสร้างแอลคาลอยด์ (Alkaloid production medium)

สูตรนี้เป็นสูตรที่กระตุ้นให้แคลลัสสร้างแอลคาลอยด์มีการแปรของชนิดและปริมาณธาตุหลักธาตุรองและไวตามินตามวิธีของ Zenk และ คณะ (1977) เพื่อความสะดวกจะเรียกอาหารสูตรนี้ว่า"AP"

เตรียมอาหารตามสูตร ในตารางที่ 1 ปรับ pH ด้วย 1/N HCl หรือ 1/N KOH บรรจุลงในขวดแก้วขนาดจุ 250 มล.ขวดละ 100 มล.นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งจัดความดันที่ 1.1 กก. ต่อตารางเซ็นติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที

4. การเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.1 การฆ่าเชื้อที่ผิวของยอดอ่อน

นำยอดที่มีความยาว 5-7 เซนติเมตร ซึ่งตัดจากท่อนรากปักชำในข้อ 2 มาล้างด้วยน้ำสบู่แล้วล้างออกด้วยน้ำประปาให้สะอาด จากนั้นจุ่มยอดลงในเอธิลแอลกอฮอล์ 10% ประมาณ 30 วินาที แล้วจึงย้ายลงในสารละลายคลอรอกซ์ 15% เติม Tween20 4-5 หยด เพื่อช่วยลดแรงตึงผิวเขย่าขวดอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 15 นาที เช็ดขวดเขย่าด้วยแอลกอฮอลย้ายเข้าตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ ต่อไปจึงย้ายยอดลงมาล้างในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง นำมาวางใน petridish ตัดแบ่งยอดออกเป็นปลายยอด ใบ ข้อ และปล้อง จากนั้นย้ายแต่ละส่วนลงฆ่าเชื้อต่อไปในสารละลายคลอรอกซ์ 1% เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง จากนั้นจึงย้ายมาเลี้ยงในวุ้นอาหารที่มีแต่น้ำตาลซูโครส 3% เก็บไว้ในที่มืดภายในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อประมาณ 5 วัน เพื่อตรวจการปลอดเชื้อ

การเก็บข้อมูล :

ศึกษาการติดเชื้อของส่วนต่างๆของยอดเปรียบเทียบกัน เพื่อหาเปอร์เซนต์การปลอดเชื้อ

4.2 การชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อแคลลัส

จากการทดลองที่ 4.1 มีแต่ส่วนปล้องเท่านั้นที่ไม่ติดเชื้อเป็นเปอร์เซนต์สูง ดังนั้นจึงใช้แต่ปล้องในการทดลอง ตัดแบ่งปล้องออกเป็นท่อนเล็กๆ ความยาวท่อนละ 5 มม.แล้วย้ายไปเลี้ยงใน Callus induction meduim โดยวางในแนวราบแบ่งไปเลี้ยงในที่สว่างและที่มืด ที่สว่างใช้ชั้นเลี้ยงที่มีไฟจากหลอด Gro-lux มีความเข้มของแสงบริเวณเนื้อเยื่อประมาณ 1,500 luxช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ส่วนที่มืดใช้ตู้เหล็กทึบให้ความมืดตลอด ดังนั้นในการทดลองซึ่งมี 6 การทดลอง แต่ละการทดลองจะมีชิ้นส่วนของปล้องทุกสายพันธุ์

การเก็บข้อมูล :

ศึกษาระยะเวลาในการชักนำให้เกิดแคลลัส ลักษณะการเกิดและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัส และหาเปอร์เซนต์การชักนำแคลลัสในแต่ละการทดลองเปรียบเทียบกัน

4.3 การคัดแยกและขยายปริมาณเนื้อเยื่อแคลลัส

เนื้อเยื่อแคลลัสที่ผ่านการชักนำและมีอายุประมาณ 4 สัปดาห์ นำมาตัดแบ่งเป็นชิ้นบางๆ ความหนาชิ้นละประมาณ 2 มิลลิเมตรวางบนผิวของอาหารวุ้นสูตรเดิม ตัดแบ่งเนื้อเยื่อในลักษณะนี้ทุกๆ 4 สัปดาห์ จนกระทั่งเนื้อเยื่อเริ่มมีพื้นผิวและสีต่างๆ เกิดขึ้นในก้อนเดียวกัน แยกเนื้อเยื่อที่มีสัณฐานต่างกันโดยการสังเกต (visual selection) ตามวิธีของ Widholm (1980) จำนวนความแตกต่างของสีซึ่งใช้เป็นเกณฑ์ในการแบ่งแคลลัสจะเป็นเท่าใดขึ้นกับความเหมาะสมในการขยายปริมาณเฉพาะสายพันธุ์ และ/หรืออาหารสูตรที่มีการเจริญดีเท่านั้น มิได้ขยายทั้งหมด แคลลัสที่แยกแล้วยังคงเลี้ยงต่อไปในอาหารสูตรเดิมขยายปริมาณทุกๆ 5 สัปดาห์

การเก็บข้อมูล :

บันทึกจำนวนกลุ่มแคลลัสที่แยกได้ โดยยึดถือสีเป็นเกณฑ์และจำนวนสายพันธุ์แคลลัสที่ได้ทั้งหมด

5 การศึกษาการแปรทางสัณฐานวิทยาบางประการ

นำแคลลัสแต่ละสายพันธุ์มาศึกษาลักษณะพื้นผิวของเนื้อเยื่อแคลลัสด้วยกล้อง จากนั้นแบ่งเนื้อเยื่อจำนวนหนึ่งจากสายพันธุ์ต่างๆลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิม วางบนเครื่องเขย่าเนื้อเยื่อที่มีอัตราการเหวี่ยง 130 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5-7 วัน เพื่อให้แคลลัสแยกออกจากกันเป็นเซลล์แขวนลอยใช้หลอดหยดดูดสารละลายอาหารมาหยดบนแผ่นสไลด์ ศึกษารูปร่างของเซลล์และรงควัตถุภายในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

การเก็บข้อมูล :

บันทึกลักษณะพื้นผิวของแคลลัสรูปร่างของเซลล์แขวนลอยรวมทั้งรงควัตถุที่เห็นภายใน ถ่ายภาพจากกล้องเก็บไว้

6 การศึกษาการแปรของรูปแบบการเจริญ

นำแคลลัสที่เจริญใหม่อายุ 4 สัปดาห์ตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตรปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร แต่ละขวดวางแคลลัสลงเลี้ยง 5 ชิ้นศึกษาการเจริญของแคลลัสทุกสัปดาห์ โดยเปรียบเทียบน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งที่เปลี่ยนแปลงไปติดต่อกัน 7 สัปดาห์ ในการหาน้ำหนักเมื่อครบแต่ละสัปดาห์ นำแคลลัส 5 ชิ้น ออกมาชั่งน้ำหนักสดรวมแล้วเฉลี่ยค่าที่ได้จะเป็นน้ำหนักสดประจำสัปดาห์นั้น จากนั้นนำแคลลัสไปอบให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักแห้งรวมเฉลี่ยค่าที่ได้จะเป็นน้ำหนักแห้งประจำสัปดาห์

การเก็บข้อมูล :

1 นำค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งประจำสัปดาห์ต่างๆ มาหาค่าดัชนีการเจริญ (Growth Index)ตามวิธีของ Staba และคณะ(1982) ดังนี้

GI_{FWi} = FW_i/FW_o

และ GI_{DWi} = DW_i/DW_o

เมื่อ GI_{FW} คือ ดัชนีการเจริญเทียบจากนน.สด ประจำสัปดาห์ที่ 2

GI_{DW} คือ ดัชนีการเจริญเทียบจากนน.แห้ง ประจำสัปดาห์ที่ 2

FW_i คือ นน.สดประจำสัปดาห์ที่ i

FW_o คือ นน.สดเริ่มต้น

DW_i คือ นน.แห้งประจำสัปดาห์ที่ i

DW_o คือ นน.แห้งเริ่มต้น

เขียนกราฟแสดงความสัมพันธุ์ระหว่างดัชนีการเจริญกับระยะเวลาในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ หาค่าดัชนีการเจริญเติบโตสูงสุด

2 นำค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งทั้งหมดมาเขียนแผนภูมิแสดงความสัมพันธุ์กับระยะเวลาในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการเจริญ

3 สรุปค่าที่ได้ทั้งหมดแสดงในตารางเพื่อแสดงการแปร

7 การศึกษาการแปรของรูปแบบการผลิตรอโวลเพียแอลคาลอยด์

7.1 การตรวจแอลคาลอยด์ในแคลลัส

นำแคลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ที่เลี้ยงใน callus induction meduim ที่ย้ายใหม่อายุ 4 สัปดาห์ ย้ายลงในอาหารสูตร AP ทั้งก้อนแคลลัสกดให้จมลงในอาหารวุ้นประมาณ 1ใน 3 ของปริมาตร เลี้ยงต่อไปใน

สภาพแวดล้อมเดิมอีก 2 สัปดาห์ จากนั้นนำมาตรวจการมีแอลคาลอยด์โดยวิธีบดเซลล์ (cell squash method) ตามวิธีของ Ogino และคณะ(1978) โดยอาศัยหลักการที่ว่าเมื่อเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารภายใน cell sap กับสารที่ทำให้เกิดสี (chromogenic reagents) ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะมากหรือน้อยขึ้นกับความเข้มของแอลคาลอยด์ใน cell sap โดยเอาชิ้นส่วนเล็กๆ ของแคลลัสเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 3 มม. จำนวน 5 ชิ้นต่อสายพันธุ์ วางบนกระดาษกรองสอดแผ่นกระดาษกรองระหว่างกระจก 2 แผ่น วางบนโต๊ะ แล้วกดกระจกเข้าหากันเพื่อ
ให้เซลล์แตก cell sap จะถูกดูดซับไว้บนกระดาษกรอง เขี่ยเศษเซลล์ทิ้งไปพลิกแผ่นกระดาษกรองด้านล่างขึ้นแล้วพ่น Dragendorff's reagent ลงไป สังเกตความเข้มของสีที่เกิดขึ้น

การเก็บข้อมูล

ให้คะแนนความเข้มของสีส้มอมแดงที่เกิดขึ้น ประมาณเฉลี่ยจาก 5 ค่าดังนี้ - = ไม่มีสี + = น้อย ++ = ปานกลาง +++ = เข้ม ++++ = เข้มมาก สายพันธุ์ที่มีคะแนนลบเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีแอลคาลอยด์ดังนั้นจึงไม่ขยายปริมาณแคลลัสเพิ่มเพื่อการวิเคราะห์ ส่วนสายพันธุ์ที่ให้ปฏิกิริยาสีนำมาขยายปริมาณให้มากในสูตรชักนำประมาณ 4 สัปดาห์ แล้วย้ายมาเลี้ยงในสูตร AP 2 สัปดาห์ตามวิธีข้างต้น

7.2 การสกัดแอลคาลอยด์ (Crude Alkaloids Extraction)

7.2.1 นำแคลลัสและรากมาชั่งน้ำหนักสด และอบให้แห้งในตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียสประมาณ 3 วัน นำมาชั่งน้ำหนักแห้งแล้วบดให้ละเอียดเป็นผงเพื่อนำไปสกัดต่อไป การสกัดนี้เลือกทำเฉพาะรากสายพันธุ์ RV1 RV2 และ RE5 รวมทั้งแคลลัสทุกสายพันธุ์ที่เจริญมาจากรากสายพันธุ์ดังกล่าว แคลลัสสายพันธุ์ที่มีปริมาณน้อยมาก หรือตรวจพบว่ามีแอลคาลอยด์ต่ำจะยังไม่นำมาสกัด และตรวจสอบแอลคาลอยด์ในระยะนี้

7.2.2 ดำเนินการสกัดแอลคาลอยด์ตามวิธีที่ดัดแปลงจากของ Hochstein และคณะ(1955) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อสายพันธุ์เพื่อหาค่าเฉลี่ยของสารสกัด ดังนั้นปริมาณผงบดที่ใช้จึงเป็นดังนี้ รากทุกสายพันธุ์ใช้ 1 กรัมต่อซ้ำ แคลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ใช้ 5 กรัมต่อซ้ำ ส่วนสายพันธุ์ที่มีแคลลัสปริมาณน้อยใช้เพียง 0.5 กรัม

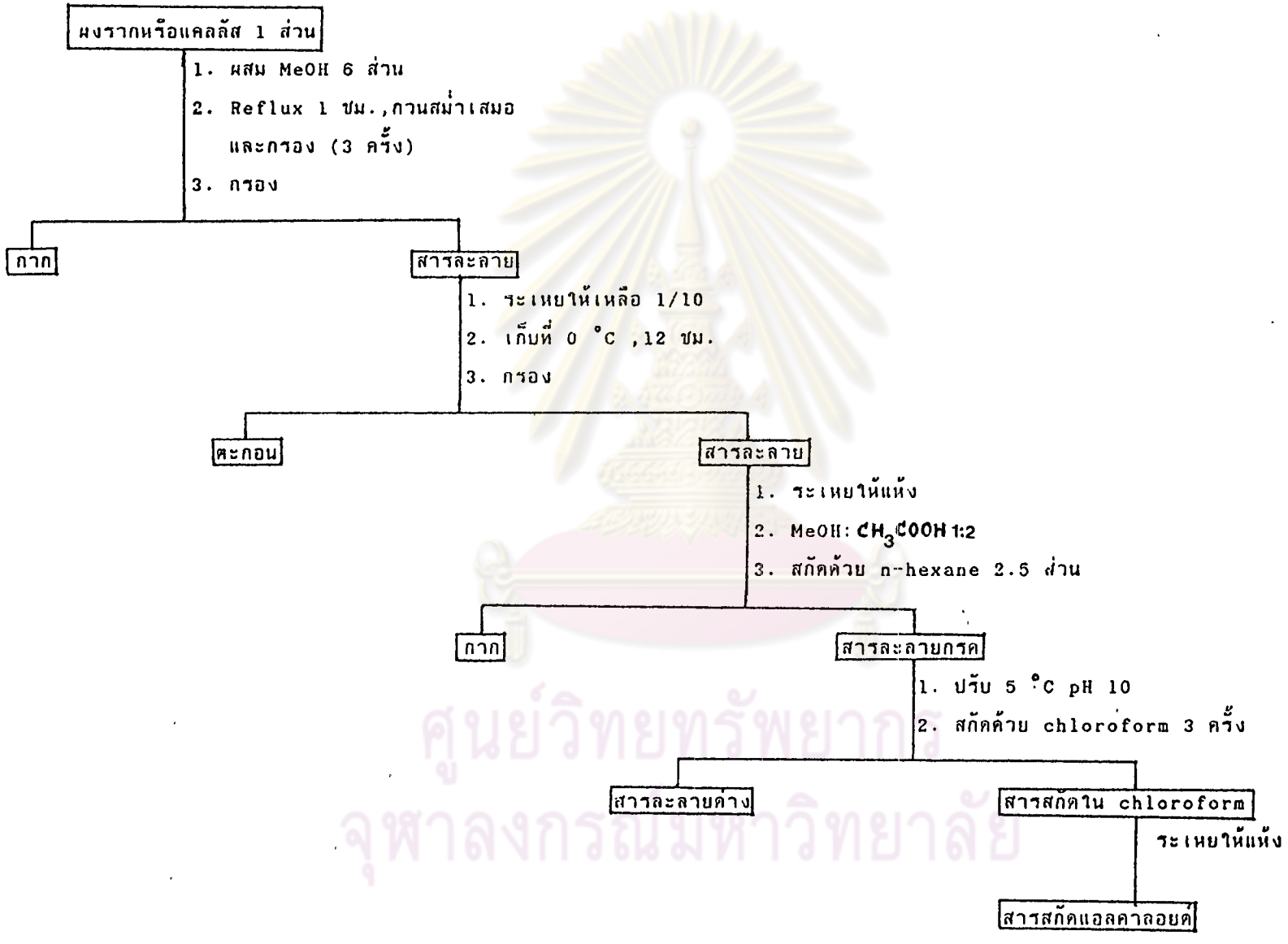
7.2.3 วิธีสกัดเริ่มโดยนำผงละเอียด 1 ส่วนผสมกับเมธานอล 6 ส่วนในขวดแก้วขนาด 50 มิลลิลิตรนำไป reflux ประมาณ 1 ชั่วโมงบน stir& hot plate ให้ได้รับการกวนอย่างสม่ำเสมอตลอดเวลาจากนั้นกรองเอาแต่สารละลายเก็บไว้ สกัดซ้ำอีกสองครั้ง นำสารละลายที่ผ่านการกรองทุกครั้งรวมกัน ระเหยบน steam bath ให้งวดประมาณ 1/10 ของปริมาตร เก็บในตู้เย็นที่ 0 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง จนตกตะกอนโดยสมบูรณ์ กรองเอาแต่สารละลายไประเหยให้แห้งบน steam bath

7.2.4 ระเหยสารสกัดที่ทำแห้งนี้ด้วยเมธานอล 1 ส่วน ผสมกับสารละลายกรดอะซิติก 5% 2 ส่วน สกัดกับนอร์มอลเฮกเซน 2.5 ส่วน เพื่อขจัดสารเหนียวจำพวกเรซินและน้ำมัน นำสารละลายกรดมาทำให้เย็นลงถึง 5 องศาเซลเซียส แล้วปรับ pH ให้เป็น 10 แล้วสกัดกับคลอโรฟอร์ม 3 ครั้ง นำชั้นคลอโรฟอร์มระเหยให้แห้งก็จะได้สารสกัดแอลคาลอยด์(ขั้นตอนตามภาพที่ 4)

7.2.5 อบบีกเกอร์ขนาด 10 มิลลิลิตร ที่ล้างอย่างสะอาดและอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน ละลายสารสกัดแอลคาลอยด์ด้วยเมธานอลปริมาตรเล็กน้อยรินใส่บีกเกอร์แล้วระเหยให้แห้งบน steam bath นำกลับมาชั่งน้ำหนักบีกเกอร์ใหม่ผลต่างของน้ำหนัก ทั้ง 2 ครั้งเป็นน้ำหนัก ของสารสกัดแอลคาลอยด์

<u>การเก็บข้อมูล</u>

1 หาเปอร์เซนต์ของสารสกัดแอลคาลอยด์ในราก และแคลลัสเปรียบเทียบกัน



ภาพที่ 4 การสกัดแอลคาลอยด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

29

2 เปรียบเทียบการแปรของสารสกัดแอลคาลอยด์กับน้ำหนักแห้งในรูปแบบภูมิแห่ง

7.3 การตรวจสอบแอลคาลอยด์โดยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

วิธี TLC นับได้ว่า สามารถแยกรอไวลเพียแอลคาลอยด์ได้รวดเร็ววิธีหนึ่ง (Court and Habib,1973) และเมื่อใช้ layer เป็น silica gel สามารถแยกแอลคาลอยด์ได้ดีกว่าตัวดูดซับ (absorbant) อื่น (Court,1966)

7.3.1 <u>การตรวจสอบในเชิงคุณภาพ</u> :

7.3.1.1 ดำเนินการทดลองตามวิธีของ Court (1966),Court และคณะ(1972)Court และ Habib(1973), Court และ Timmins (1975) และ Court และ Iwu (1980) โดยเตรียมสารละลายเข้มข้น 0.1% ของแอลคาลอยด์มาตรฐาน ชั่งละลายในสารละลายผสมระหว่างเมธานอลกับอะซิโตน อัตราส่วน 1:1 สำหรับ deserpidine ชนิดเม็ด (0.25 มก.) ชั่งน้ำหนักเม็ดรวม 5 เม็ด เฉลี่ยหาน้ำหนักที่แท้จริงของ 1 เม็ด บดให้ละเอียดแล้วชั่งให้ได้น้ำหนัก 4 เม็ด (มี deserpidine อยู่ 1 มก.) นำไปสกัดด้วยสารละลายข้างต้น กรองเอาแต่ filtrate มาระเหยบน steam bath จนแห้งจากนั้นละลายกากด้วยสารละลายผสมดังกล่าว ต่อไปจึงเตรียมสารละลายของแอลคาลอยด์ โดยนำกากของแอลคาลอยด์ละลายโดยวิธีเดียวกันให้มีปริมาตร 2 มิลลิลิตร

7.3.1.2 ขั้นต่อไปเตรียมแผ่น TLC โดยใช้ Kieselgel GF_{254} เคลือบบนกระจกขนาด 20x20x0.3 ซม. ให้ชั้นผิวบาง 250 ไมโครเมตร แล้วอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียล 1 ชม.จากนั้นเก็บไว้ใน desiccator จนกว่าจะใช้หยดสารละลายแอลคาลอยด์มาตรฐานและสารละลายแอลคาลอยด์หยาบลงบนแผ่น แต่ละจุดให้มีปริมาตร 10 ไมโครลิตร

โดยจุดทีละน้อยๆ ทุกๆ 5 วินาทีเพื่อรักษาขนาดของจุดให้คงที่ เสร็จแล้วนำไปวางในโถแก้วที่อิ่มตัวด้วยระบบของตัวทำละลาย ซึ่งมีกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 วางรอบผนังโถแก้วเพื่อช่วยการอิ่มตัว ทำทั้งหมด 7 ระบบ (ดูข้อ 2.6)แผ่น TLC วางทำมุมกับผนังโถแก้วประมาณ 15 องศา เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นมาบนแผ่นเป็นระยะทาง 15 ซม. จึงยกออกมาทำให้แห้งด้วยที่เป่าลมร้อนประมาณ 5 นาที แล้วอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชม.เพื่อขจัดตัวทำละลายให้หมดไป จากนั้นนำแผ่น TLC ไปพ่นด้วย ferric chloride - perchloric acid reagent จากนั้นจึงเป่าด้วยลมร้อนอีกประมาณ 10-15 นาที พิจารณาจุดสีที่เกิดขึ้นและวัดระยะห่างระหว่างจุดแอลคาลอยด์ที่แยกตัวออกกับจุดเริ่มต้น

7.3.1.3 ทำการทดลองใหม่ แต่เลือกใช้ระบบที่แยกแอลคาลอยด์ได้ดีที่สุดเพียงระบบเดียว เมื่อทำแผ่นให้ปราศจากตัวทำละลายแล้วนำไปส่องดูการเรืองแสงภายใต้หลอดอุลตร้าไวโอเล็ต ช่วงคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร สังเกตการเรืองแสง จากนั้นจึงพ่นแผ่น TLC ด้วยสารทำปฏิกิริยาให้สีทั้ง 4 ชนิด (ดูข้อ 2.5) โดยแยกทำในแต่ละแผ่น พิจารณาสีที่เกิดแตกต่างกัน

7.3.1.4 นำแผ่น TLC สำเร็จรูป(Kieselgel-60F254 มาแบ่งเนื้อที่แผ่นออกเป็นช่องๆเล็กๆ ความกว้างประมาณ 14 ซม. จากนั้นจุดแอลคาลอยด์มาตรฐาน และสารสกัดแอลคาลอยด์ลงบนแผ่น จากนั้นนำแผ่นไป develope ตามขั้นตอน หลังจากแผ่นปราศจากตัวทำละลายแล้วจึงนำไปตรวจด้วยเครื่อง TLC scanner จัด function ของเครื่องเป็น spectra measurement แล้วหา maximum and minimum reflection absorption spectra จากนั้นเปลี่ยน function เป็น chromatogram measurement ในระบบช่วงคลื่นเดี่ยว (single wavelength) เลือกใช้ช่วงคลื่นที่เป็น common absorption แล้วหารูปแบบของ โครมาโตแกรม

<u>การเก็บข้อมูล</u>

1.ศึกษาค่า hRf ของแอลคาลอยด์มาตรฐานในระบบตัวทำละลาย

ทั้ง 7 และ hRf ของแอลคาลอยด์ที่ถูกแยกในระบบตัวทำละลายที่แยกดีที่สุด ซึ่งคำนวณได้จาก

$$hRf = \frac{\text{ระยะระหว่างจุดแอลคาลอยด์กับจุดเริ่มต้น} \times 100}{\text{ระยะทางของแนวตัวทำละลาย}}$$

2.บันทึกสีของการเรืองแสงของแอลคาลอยด์ภายใต้แสงอุลตร้า-ไวโอเลตทั้ง 2 ช่วงคลื่น

3. บันทึกปฏิกิริยาสีของแอลคาลอยด์กับสารทำปฏิกิริยาให้สีต่างๆ เทียบจากตารางปฏิกิริยาสีของ Court และ Iwu(1980) การประมาณระดับสีใช้เทียบกับตารางแถบสีมาตรฐาน ซึ่งใช้ของ Horticultural color - guide (Rosch, N.J.,U.S.A)

4.ศึกษาช่วงคลื่นที่เป็น maximum และ minimum reflection absorption ของแอลคาลอยด์มาตรฐาน และแอลคาลอยด์ที่ปรากฏเป็นแอลคาลอยด์หลักในสารสกัดแอลคาลอยด์

5.ศึกษารูปแบบโครมาโตแกรมของแอลคาลอยด์มาตรฐานและสารสกัดแอลคาลอยด์

7.3.2 การตรวจสอบในเชิงปริมาณ

7.3.2.1 ดำเนินการตรวจสอบด้วยวิธี TLC densitometry ในลักษณะเดียวกับการวิจัยของ Furuya และคณะ (1983) โดยอาศัยการคำนวณความหนาแน่นของจุดแอลคาลอยด์มาตรฐานกับจุดแอลคาลอยด์ของตัวอย่าง บนแผ่น TLC และแปรค่าที่ได้ออกมาเป็นความเข้มข้น ในการนี้แอลคาลอยด์อ้างอิงเพียงชนิดที่พบในรูปแบบโครมาโตแกรมตามข้อ 7.3.1.4 เท่านั้นดังนี้ กรณีของ ajmaline และ yohimbine ใช้ความเข้มข้น 0.025% ส่วน corynanthine และ reserpine ใช้ 0.010%

7.3.2.2 จุดแอลคาลอยด์มาตรฐาน และสกัดแอลคาลอยด์ลงบนแผ่น TLC สำเร็จรูปเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 7.3.1.4 ความเข้มข้นของแอลคาลอยด์มาตรฐานใช้ 2 ค่า เป็นอัตรา 1:2 ซึ่งกันและกัน สารสกัดแอลคาลอยด์จุดบนแผ่น 3 ครั้ง ปริมาณเท่ากัน (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) หลังจาก develope จนครบตามขั้นตอนแล้วจึงวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC scanner ใน

function การวัดโครมาโตแกรมโดยวิธีการคำนวณความเข้มข้นแบบ external standard 2-point ของระบบ program scanning ทำ calibration ของแอลคาลอยด์มาตรฐาน แล้วจึงจัดปริมาณตัวอย่างออกมาเป็นไมโครกรัม

การเก็บข้อมูล

1. คำนวณความเข้มข้นของแอลคาลอยด์ ที่ทราบชนิดในสารสกัดแอลคาลอยด์จากรากและ แคลลัสสายพันธุ์ต่างๆ ในรูปเปอร์เซนต์เฉลี่ย

2. เปรียบเทียบการแปรของปริมาณในรูปแผนภูมิ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย