บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 พืชตัวอย่าง

พืชตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้คือ ต้นมะไฟนกคุ่ม *Ammannia baccifera* Linn. ,ต้นผักไผ่น้ำ *Polygonum hydropiper* Linn. ซึ่งเก็บจากกองวัชพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ และเมล็ดมะคำดีควาย *Sapindus rarak* DC. ซื้อจากร้านเวชพงษ์โอสถ กรุงเทพฯ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะต้นไม้จากกรมป่าไม้แล้วมีลักษณะเหมือนกัน โดยมีหมายเลขกำกับต้นไม้คือ B.K.F (Bangkok Forest) เท่ากับ 56196 (SN 033072), 65443 (SN 047724) และ 97812 (SN 056898) ตามลำดับ

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองและวิเคราะห์สาร

3.2.1 เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator)

3.2.2 เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Fisher- John Melting Point Apparatus) ของบริษัท Fisher Scientific สหรัฐอเมริกา

3.2.3 เครื่อง Chromatotron รุ่น 7924t ของบริษัท Harrison Research สหรัฐอเมริกา

3.2.4 Fourier Transformed Infrared Spectrophotometer (FT-IR) รุ่น Impact 410 ของบริษัท Nicolet สหรัฐอเมริกา ใช้เทคนิคทางด้าน KBr pellet

3.2.5 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Fourier Transform) รุ่น JNM-A500 ของบริษัท Jeol ญี่ปุ่น และรุ่น AC-F200 ของบริษัท Bruker เยอรมัน

3.2.6 Gas Chromatograph (GC) model GC-7AG ของบริษัท Shimudzu ญี่ปุ่น

3.2.7 Gas Chromatograph-Mass Spectrometer (GC-MS)

3.2.8 UV lamp ใช้ตรวจสอบสารที่ดูดกลืนแสงในช่วง UV บนแผ่น TLC

3.2.9 Oxi-miter จากบริษัทดีทแฮล์ม ประเทศไทย จำกัด

3.3 สารเคมี

3.3.1 ตัวทำละลาย (Solvent) ตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลองได้แก่ เฮกเซน ,ไดคลอโรมีเทน, เอทิลอะซิเตท, บิวทานอล, เอทานอล, เมทานอล, อีเทอร์, อะซิโตนและคลอโรฟอร์ม ส่วนใหญ่ใช้ชนิด commercial grade ซึ่งต้องนำมากลั่นก่อนใช้ทุกครั้ง สำหรับตัวทำละลายที่ใช้ในการตกผลึกใช้ชนิด Reagent grade

3.3.2 ตัวดูดซับ (Adsorbent)

- ซิลิกาเจลชนิด 60G Art.7734 สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี
- ซิลิกาเจลชนิด $60PF_{254}$ (7749) สำหรับโครมาโททรอน
- ซิลิกาเจลชนิด 60G.Art.7731 สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว
- แผ่น TLC (Thin Layer Chromatrography) สำเร็จรูป ซิลิกาเจลชนิด $60F_{254}$ ของบริษัท E.Merck,Darmstadt

3.3.4 รีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาเคมี คือ แอซิติกแอนไฮไดรด์, กรดซัลฟุริกเข้มข้นและคลอโรฟอร์ม

3.3.5 สารมาตรฐาน

- Rotenone ของบริษัท Aldrich และ 1,4-Naphthoquinone ของบริษัท Fluka สวิทเซอร์แลนด์
- แผ่นยามาตรฐาน Ampicillin 10 unit Streptomycin 10 unit Chloramphenicol 30 unit Tetracyclin 30 unit ของบริษัท Becton Dickinson สหรัฐอเมริกา
- อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Mac Conkey Agar , Mueller Hinton Medium (MHM) ของบริษัท Difco Laboratories สหรัฐอเมริกา

3.4 ชนิดสัตว์และจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.4.1 ไรสีน้ำตาล *Artemia salina* ไข่ไรสีน้ำตาลของบริษัท Ocean star international สหรัฐอเมริกา

3.4.2 ลูกปลาตะเพียนขาว *Puntius gonionotus* ได้รับความอนุเคราะห์จากฝ่ายเพาะเลี้ยงของสถานีประมงน้ำจืด จังหวัดมหาสารคาม อายุ 15-20 วัน

3.4.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคบางชนิดที่ใช้ทดสอบคือ *Staphylococcus aureus* *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม

3.5 การสกัดสารจากต้นมะไฟนกคุ่ม, ต้นผักไผ่น้ำและเมล็ดมะคำดีควาย

3.5.1 การสกัดสารจากต้นมะไฟนกคุ่ม, ต้นผักไผ่น้ำและเมล็ดมะคำดีควายด้วยตัวทำละลายเอทานอล

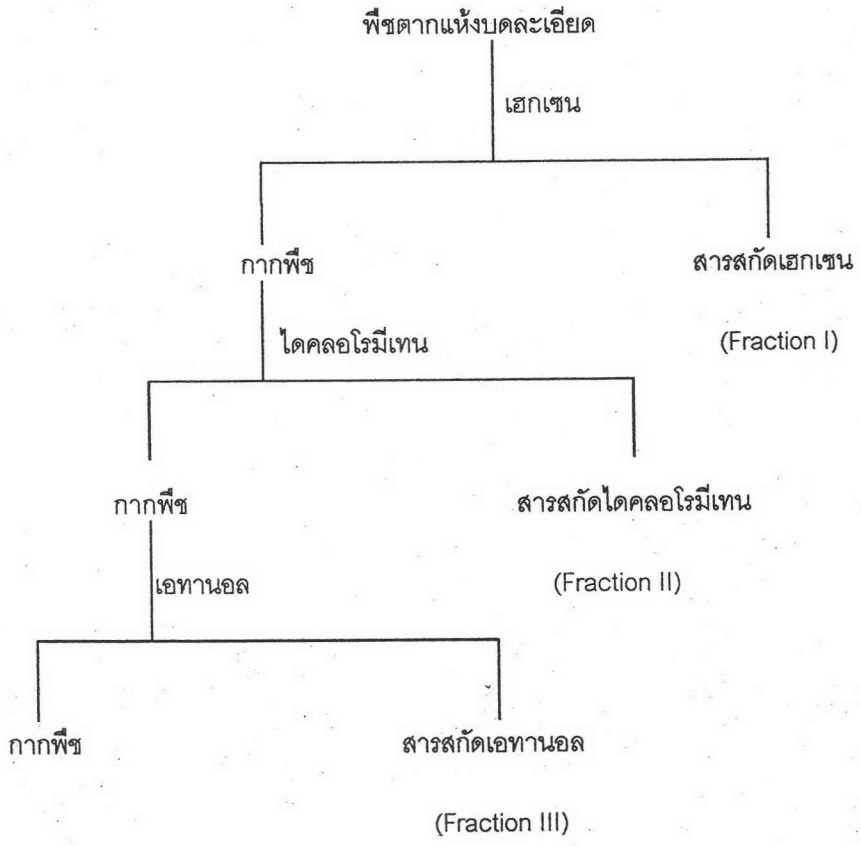
นำต้นมะไฟนกคุ่ม *Ammannia baccifera*, 934.60 กรัม, ต้นผักไผ่น้ำ *Polygonum hydropiper*, 100.00 กรัม และเมล็ดมะคำดีควาย *Sapindus rarak*, 863.33 กรัม ตากแห้งและบดละเอียดนำมาแช่ในตัวทำละลายเอทานอล 3-4 วัน จากนั้นกรองเอากากออก นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ โดยทำการแช่ในตัวทำละลายหลาย ๆ ครั้งเพื่อสกัดสารออกมาให้มากที่สุด จากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากพืชแต่ละชนิดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นกับไรสีน้ำตาล

3.5.2 การสกัดสารจากต้นมะไฟนกคุ่ม, ต้นผักไผ่น้ำและเมล็ดมะคำดีควายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน,ไดคลอโรมีเทนและเอทานอล

นำมะไฟนกคุ่ม *Ammannia baccifera*, 3.80 กก., ต้นผักไผ่น้ำ *Polygonum hydropiper*, 100.00 กรัมและเมล็ดมะคำดีควาย *Sapindus rarak*, 4.00 กก. ตากแห้งและบดละเอียดนำมาแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน 3-4 วัน จากนั้นกรองเอากากออกนำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ โดยทำการแช่ในตัวทำละลายหลาย ๆ ครั้งเพื่อสกัดสารออกมาให้มากที่สุด จะได้สารสกัดเฮกเซน ส่วนกากพืชที่เหลือนำไปแช่ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 3-4 วัน กรองและนำสารละลายไประเหยแห้งจะได้สารสกัดไดคลอโรมีเทน ส่วนกากพืชที่เหลือนำไปแช่ในตัวทำละลายเอทานอล 3-4 วัน กรองและนำสารละลาย

ไประเหยแห้งจะได้สารสกัดเอทานอล การสกัดสารจากพืชแต่ละชนิดแสดงดังแผนภาพที่ 3.1 จากนั้นนำสารสกัดแต่ละชนิดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นกับไรสีน้ำตาล

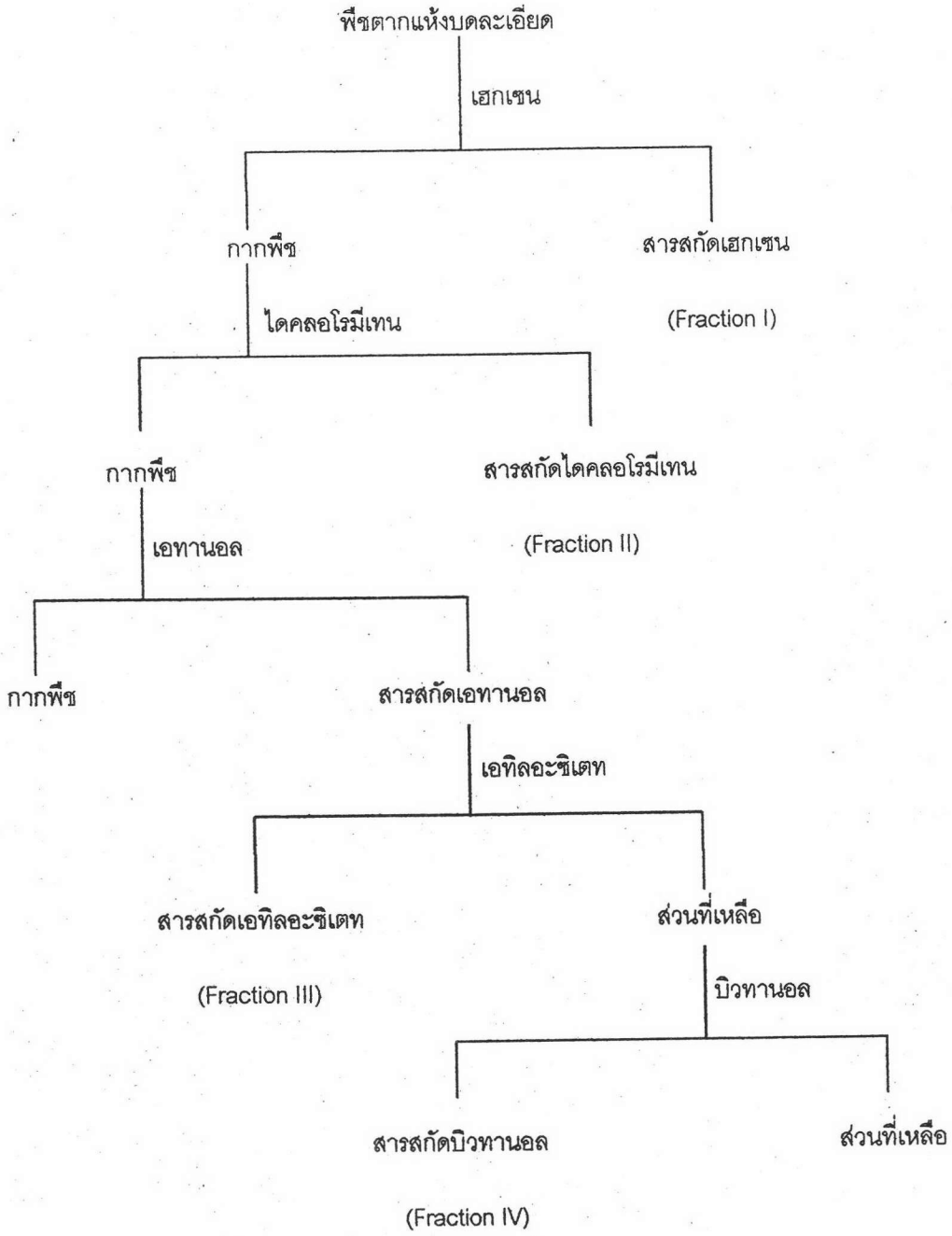
แผนภาพที่ 3.1 การสกัดต้นมะไฟนกคุ่ม,ต้นผักไผ่น้ำและเมล็ดมะคำดีควายในตัวทำละลายแต่ละชนิดตามลำดับความมีขั้ว



3.5.3 การสกัดสารจากต้นมะไฟนกคุ่มด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ตามลำดับความมีขั้ว

นำต้นมะไฟนกคุ่ม *Ammannia baccifera* ตากแห้งและบดละเอียดนำมาแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน 3-4 วัน จากนั้นกรองเอากากออก นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ โดยทำการแช่ในตัวทำละลายหลาย ๆ ครั้งเพื่อสกัดสารออกมาให้มากที่สุด จะได้สารสกัดเฮกเซน ส่วนกากพืชที่เหลือนำไปแช่ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 3-4 วัน กรองและนำสารละลายไประเหยแห้งจะได้สารสกัดไดคลอโรมีเทน ส่วนกากพืชที่เหลือนำไปแช่ในตัวทำละลายเอทานอล 3-4 วัน กรองและนำสารละลายไประเหยแห้งจะได้สารสกัดเอทานอล จากนั้นนำสารสกัดเอทานอลมากวนด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท 3-4 ครั้งจนสารละลายใส นำไปกรองและระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารสกัดเอทิลอะซิเตท จากนั้นนำส่วนที่เหลือไปกวนต่อด้วยตัวทำละลายบิวทานอล 3-4 ครั้งเช่นเดียวกัน กรองและระเหยแห้งจะได้สารสกัดบิวทานอล การสกัดสารจากต้นมะไฟนกคุ่มด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดแสดงดังแผนภาพที่ 3.2 จากนั้นนำสารสกัดแต่ละชนิดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นกับไรสีน้ำตาล และปลาตะเพียนขาว

แผนภาพที่ 3.2 การสกัดต้นมะไฟนกคุ่มด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดตามลำดับความมีขั้ว



3.6 **เทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการแยกสาร**

3.6.1 **การกลั่น** (Distillation)

คือ การแยกตัวทำละลายที่มากเกินพอออกจากสารละลาย โดยให้ไอของตัวทำละลายผ่านเครื่องควบแน่น และตัวทำละลายที่ควบแน่นนี้ สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก การกลั่นที่ใช้มี 2 แบบ คือ การกลั่นแบบธรรมดา ใช้กับตัวทำละลายจุดเดือดต่ำ คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน อีกแบบคือ การกลั่นโดยใช้เครื่องกลั่นลดความดันหรือเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ใช้กับตัวทำละลายที่มีจุดเดือดสูงคือ เมทานอล, เอทานอล เพื่อให้ตัวทำละลายเป็นไอก่อนถึงจุดเดือด และช่วยป้องกันการสลายตัวของสารที่สกัดได้

3.6.2 **คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว** (Quick Column Chromatography)

การแยกสารโดยวิธีนี้เป็นการแยกสารออกเป็นกลุ่มใหญ่ก่อนเพื่อความรวดเร็ว แล้วจึงนำสารที่แยกได้ไปแยกต่อหรือทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีที่เหมาะสมต่อไป คอลัมน์ที่ใช้ในการทำโครมาโท์กราฟีแบบนี้ใช้กรวยแก้วที่มีรูปทรงเช่นเดียวกับกรวยบุคเนอร์ ก้นกรวยเป็น Sintered glass ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกรวย 12 เซนติเมตร สูง 1 เซนติเมตร ปลายด้านล่างของกรวยแก้วต่อขวดกรองดูดซึ่งต่อกับเครื่องดูดอากาศเพื่อดูดอากาศผ่านคอลัมน์ให้สารละลายไหลลงอย่างรวดเร็ว โดยใช้ซิลิกาเจล 60G Art.7731 เป็นตัวดูดซับ วางกระดาษกรองขนาดพอดีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของกรวยแก้วที่ก้นกรวย เปิดเครื่องดูดอากาศ แล้วค่อย ๆ ใส่ซิลิกาเจลลงไปเกลี่ยให้เรียบและกดให้แน่นด้วยก้นขวดรูปชมพู่ ทำเช่นนี้เพื่อให้ซิลิกาเจลอัดตัวกันแน่นและไม่มีฟองอากาศอยู่ นำสิ่งสกัดที่ต้องการแยกมาคลุกกับซิลิกาเจลจำนวนพอสมควร บดและร่อนให้ร่วนเพื่อเวลาใส่บนคอลัมน์สารสกัดจะได้กระจายทั่วคอลัมน์และสามารถแยกสารได้ทั่วถึง ค่อย ๆใส่ของผสมนี้ลงบนซิลิกาเจล เกลี่ยให้เรียบและกดให้แน่น แล้วปิดทับผิวหน้าด้วยกระดาษกรองวงกลมที่ตัดเป็นแฉก ๆ เพื่อป้องกันไม่ให้ผิวหน้าของซิลิกาเจลถูกกระทบกระเทือนเวลาใส่ตัวทำละลายลงไปชะสารออกมา ค่อยๆ รินตัวทำละลายลงบนคอลัมน์จนท่วมซิลิกาเจล ตัวทำละลายจะละลายสารที่อยู่ในสิ่งสกัดและผ่านซิลิกาออกมา และหยุดการชะคอลัมน์โดยการปิดเครื่องดูดอากาศ

3.6.3 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

คอลัมน์ที่ใช้เป็นแก้วขนาดใหญ่เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 ซม. ยาว 120 ซม. ขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 ซม. ยาว 75 ซม. และขนาดอื่น ๆ ที่เหมาะสมกับปริมาณสารที่แยก และมีจุกเปิดปิดคอลัมน์ ใช้ซิลิกาเจล 60G Art.7734 เป็นตัวดูดซับ โดยใช้อัตราส่วนของตัวดูดซับต่อสารที่ต้องการแยกประมาณ 20 ต่อ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) การบรรจุคอลัมน์ใช้วิธีเปียก (Wet packing) โดยใช้ตัวทำละลายผสมกับตัวดูดซับให้เข้ากันแล้วค่อย ๆ เทของผสมลงในคอลัมน์ซึ่งต้องอุดสำลีไว้ใต้คอลัมน์ และมีตัวทำละลายอยู่ครึ่งคอลัมน์ ขณะเทซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ ควรเปิดตัวทำละลายให้ไหลออกอย่างช้า ๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลไหลลงไปในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ ทำเช่นนี้จนกระทั่งบรรจุซิลิกาเจลจนหมด และระดับของซิลิกาเจลไม่ลดลงอีก ปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเกือบถึงระดับของซิลิกาเจล ปิดคอลัมน์ แล้วค่อยๆบรรจุสารที่ต้องการแยกลงไป โดยสารที่ต้องการแยกหรือสิ่งสกัดควรระเหยตัวทำละลายให้แห้ง แล้วนำมาผสมกับซิลิกาเจลชนิด 60 G Art.7734 โดยใช้ปริมาณซิลิกาเจลน้อยที่สุดที่ทำให้ของผสมเป็นผงละเอียด ร่อนของผสมด้วยตะแกรงขนาดละเอียดเพื่อทำให้เป็นผงละเอียด แล้วนำใส่ในคอลัมน์ เปิดคอลัมน์ให้ระดับของสารละลายลดลงจนเกือบแห้ง ปิดคอลัมน์แล้วใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกันจำนวนเล็กน้อยล้างผิวภายในคอลัมน์ ปล่อยให้ระดับของตัวทำละลายลดลงจนเกือบแห้งอีกครั้งหนึ่ง ทำซ้ำจนผิวภายในคอลัมน์สะอาด คลุมส่วนผิวหน้าสารด้วยกระดาษกรองตัดแฉก เพื่อรักษาผิวหน้าให้เรียบ แล้วชะ (elute) คอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อไป ตลอดการทดลองต้องระมัดระวังไม่ให้ตัวทำละลายแห้งไปจากผิวหน้าของซิลิกาเจล

3.6.4 ธินแลร์เยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography)

การเตรียมภาชนะสำหรับ develop ใช้ขวดแก้วทรงกระบอกปากกว้างที่สะอาดมีฝาปิดขนาดพอที่จะใส่แผ่น TLC ได้โดยสะดวกใส่กระดาษกรองที่มีความสูงและความกว้างพอดีกับขนาดของภาชนะให้แนบติดกับผิวด้านใน เทตัวทำละลายที่เหมาะสมลงไปให้สูงจากก้นภาชนะประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดฝาภาชนะให้ตัวทำละลายซึมเปียกกระดาษกรองทั้งแผ่น เพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

การแต้มสาร นำแผ่น TLC สำเร็จรูปซึ่งตัดให้ขนาดพอเหมาะจากนั้นขีดระดับสูงสุดที่ต้องการให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปและขีดระดับที่จะแต้มสารใช้ capillary tube จุ่มลงในสารละลายที่ต้องการทดสอบ

แต้มสารนั้นบนแผ่น TLC ที่ระดับเริ่มต้นเป็นจุดกลม แต่ละจุดห่างกันพอสมควร หลังจากจุดที่แต้มสารแห้งสนิท จึงนำไป develop ต่อไป

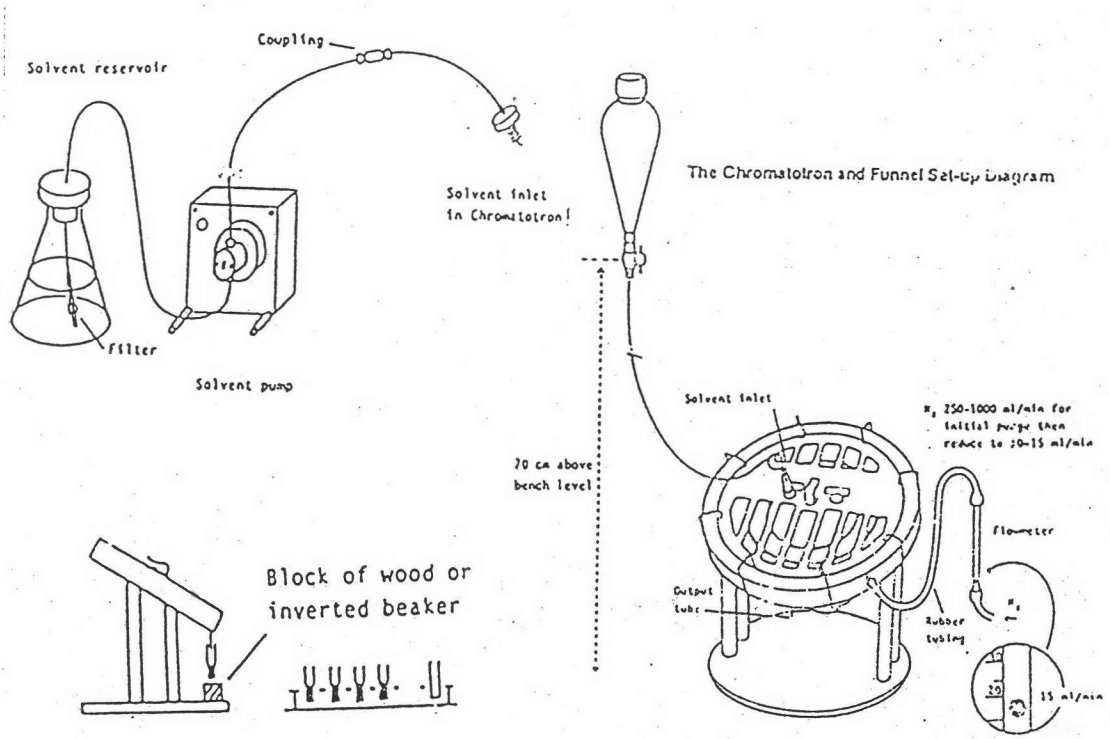
การ Develop สารโดยนำแผ่น TLC ที่แต้มสารเรียบร้อยแล้วจุ่มในภาชนะแก้วที่บรรจุตัวทำละลายที่เหมาะสม และภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายให้จุดของสารอยู่เหนือตัวทำละลายเล็กน้อย ปิดฝาภาชนะแล้วปล่อยให้ตัวทำละลายซึมขึ้นมาจนถึงระดับสูงสุดที่ขีดไว้แล้วจึงนำแผ่น TLC ออกจากภาชนะ ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแผ่น TLC แห้ง

การตรวจหาตำแหน่งของสาร นำแผ่น TLC ที่ผ่านการ develop แล้วมาส่อง UV ดูการดูดกลืนแสง UV ของสารหรือนำไส่ลงในภาชนะที่บรรจุเกล็ดไอโอดีนปิดฝาภาชนะให้สนิททิ้งไว้ให้ไอโอดีนเกิดปฏิกิริยา reversible weak complex กับสารจนปรากฏจุดสีน้ำตาล ส้ม หรือเหลือง บันทึกตำแหน่งของจุดนั้นๆ

3.6.3 **โครมาโททรอน** (Chromatotron) (Harrison Research, 1990)

การเคลือบ rotor ด้วยตัวดูดซับ สามารถทำให้ที่ความหนาต่างๆกัน ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้ทำการแยกว่ามีมากน้อยเพียงไร สำหรับตัวดูดซับที่ใช้เคลือบ rotor มี calcium sulfate 0.5 H_2O โดยขั้นแรกล้างแผ่นแก้วที่ใช้เป็น rotor ให้สะอาด ทำให้แห้ง นำ rotor ยึดเข้ากับ coating arbor ปิดขอบ rotor ด้วย masking tape ซึ่งตัวดูดซับซึ่งมี binder อยู่แล้ว ใส่ลงในขวดปากกว้างจากนั้นผสมกับน้ำเย็น (0 – 5 ^{o}C) เขย่าให้เข้ากันโดยไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น เทของผสมที่จะเคลือบลงบน rotor จับที่ center rod ดึงขึ้นลงเคาะ handle เบา ๆ กับพื้นรอง ประมาณ 5 ครั้ง เพื่อไล่ฟองอากาศออกและทำให้ตัวดูดซับที่เคลือบบน rotor เรียบสม่ำเสมอและเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ให้แข็งตัวเอา masking tape ออกจับที่ handle และหมุน rotor ไปในแนวนอน และใช้ใบมีดตามขนาดความหนาที่ต้องการหมุนตามเข็มนาฬิกาเพื่อสกัดเอาส่วนเกินออก จะทำให้ rotor ที่ถูกเคลือบแล้ว มีความหนาตามขนาดของใบมีดที่ใช้ จากนั้นเปลี่ยนเป็นใบมีดสุดท้าย เพื่อเอาตัวดูดซับที่ไม่ต้องการที่อยู่ตรงกลางและขอบนอกออก จากนั้นเอา rotor ออกจาก coating arbor และนำแผ่นที่เคลือบแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 80-90 ^{o}C ประมาณ 6-9 ชั่วโมง จึงจะนำมาใช้ได้ เมื่อนำมาติดกับเครื่องแล้วต้องทำให้ตัวดูดซับอิ่มตัวด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วที่ใช้ชะก่อนที่จะใส่สารตัวอย่างลงไป

การละลายสารตัวอย่างต้องใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม 1-3 มล. จากนั้นใช้หลอดดูดสารหรือเข็มฉีดยาดูดสารตัวอย่างแล้วฉีดเข้าไปในช่องใส่สารตัวอย่าง เมื่อใส่ตัวอย่างลงไปแล้วใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นตัวชะสารซึ่งตัวทำละลายที่ใช้ในการชะเริ่มจากตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วจนกระทั่งถึงตัวทำละลายที่มีขั้ว สำหรับการตรวจสอบสารบน Rotor โดยสารที่ดูดกลืนแสง UV จะใช้ UV lamp เป็นตัวตรวจสอบแถบของสารที่ดูดกลืนแสง UV เมื่อแถบของสารเคลื่อนที่เข้าใกล้ขอบของ Rotor จึงเริ่มเก็บตัวอย่าง จากนั้นนำแต่ละส่วนย่อย (fraction) มาทดสอบด้วย TLC



รูปที่ 3.1 ลักษณะการใส่ตัวทำละลายของเครื่องโครมาโททรอน

3.6.4 **การทดสอบปฏิกิริยาเคมี** Liebermann-Burchard Reaction (Harborne J. B. , 1984)

โดยละลายสารตัวอย่างที่จะทดสอบ 1-2 มก. ในคลอโรฟอร์ม 5-6 หยด เติมแอซิติกแอนไฮไดรด์ลงไป 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน เอียงหลอดทดลองแล้วค่อย ๆ หยดกรดซัลฟุริกเข้มข้นลงไป 1 หยด สังเกตการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นทันที ถ้าสารละลายสีเขียวหรือสีเขียวแกมน้ำเงิน แสดงว่าสารที่นำมาทดสอบเป็นสารจำพวกสเตียรอยด์ แต่ถ้าสารละลายเป็นสีแดงหรือสีม่วงแดง แสดงว่าสารที่นำมาทดสอบเป็นสารจำพวกไตรเทอรีปีนอยด์

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเทคนิคต่าง ๆ ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับไรสีน้ำตาลและแบคทีเรีย

3.7 วิธีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.7.1 วิธีทดสอบความเป็นพิษต่อไรสีน้ำตาล Microwell Cytotoxicity Assay (Solit et al,1992)

- เตรียมน้ำทะเลเทียมโดยใช้โซเดียมคลอไรด์ 38.0 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตรนำไปกรองผ่านกระดาษกรองโดยใช้เครื่องดูดสุญญากาศช่วย

- เพาะไข่ไรสีน้ำตาลในกล่องพลาสติกโดยใส่น้ำทะเลเทียมลงในกล่องพลาสติกซึ่งจะมีด้าน 2 ด้านและมีรูทะลุถึงกัน โรยไข่ไรสีน้ำตาลลงในด้านหนึ่งของกล่องและปิดด้วยกระดาษฟรอย เพื่อให้ทึบแสงแล้วคลุมกล่องด้วยผ้าขาวบาง ส่วนอีกด้านหนึ่งของกล่องเปิดโคมไฟให้สว่าง เพื่อตัวไรสีน้ำตาลที่ฟักตัวแล้วจะว่ายน้ำเข้ามาหาบริเวณที่สว่างกว่า โดยตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 21-22 °C

- เตรียมสารละลายที่จะทดลอบโดยชั่งสารตัวอย่าง 4 mg. ใช้เอทานอลช่วยละลายสารสกัด 40 µl

- เติมน้ำทะเลเทียมจำนวน 3,960 µl ได้เป็น dilution ที่ 1 นำไป sonicate เพื่อช่วยในการละลาย สารละลายมีความเข้มข้น 1,000 µg/ml

- ปิเปตสารละลายใน dilution ที่ 1 มา 400 µl เจือจางด้วยน้ำทะเลเทียม จำนวน 3,600 µl ได้เป็น dilution ที่ 2 ซึ่งมีความเข้มข้น 100 µg/ml

- ปิเปตสารละลายใน diution ที่ 2 มา 400 µl เจือจางด้วยน้ำทะเลเทียม จำนวน 3,600 µl ได้เป็น dilution ที่ 3 ซึ่งมีความเข้มข้น 10 µg/ml

- ปิเปตสารละลายใน dilution ที่ 1, 2 และ 3 ลงในหลุมไมโครเพลทหลุมละ 400 µl dilution ละ 6 หลุม (6 ซ้ำ)

- ปิเปต Artemia 100 µl ให้ได้ Artemia 5 ตัว ใส่ในแต่ละหลุมของไมโครเพลทที่เตรียมไว้ โดยมีหลุมตัวทำละลายและหลุมของน้ำทะเลเทียมเป็นตัวควบคุม

- ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 21-22 °C บันทึกจำนวน Artemia ที่ตาย ณ.เวลา 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

- นำผลที่ 6 ชั่วโมงของแต่ละความเข้มข้นไปคำนวณหาค่า LC_{50} โดยใช้โปรแกรมโพรบิท (Probit Analysis)

3.7.2 วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อปลาตะเพียนขาวโดยวิธีชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง

(Greenberg A.E, Connors J.J and Jenkins D. 1981)

- การเตรียมลูกปลาตะเพียนขาว ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากฝ่ายเพาะเลี้ยงสถานีประมงน้ำจืด จังหวัดมหาสารคาม ลูกปลามีอายุ 15 - 20 วัน ขนาดประมาณ 1.0-1.8 ซม. น้ำหนักเฉลี่ย 0.25 กรัม นำลูกปลาตะเพียนขาวมาเลี้ยงในตู้กระจกเพื่อให้คุ้นเคยกับสภาพการทดลองอย่างน้อย 4 วัน สำหรับน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงปลา ใช้น้ำกรองปล่อยพักไว้ในถังพลาสติกขนาดบรรจุ 27 แกลลอน และให้ฟองอากาศตลอดเวลาอย่างน้อย 2 วันก่อนนำไปใช้ ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เปลี่ยนน้ำเลี้ยงปลา 2 วันต่อ 1 ครั้ง งดให้อาหารปลา 1 วันก่อนการทดลอง ในการทดสอบความเป็นพิษต่อปลาจะแบ่งออกเป็น 2 ช่วง ช่วงแรกเป็นการทดสอบเบื้องต้น เพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อปลา ซึ่งแบ่งออกเป็น 5 ความเข้มข้นคือ 1000, 100, 10, 1 และ 0.1 ppm ตามลำดับ ช่วงที่สองเป็นการทดสอบอย่างละเอียด เพื่อหาค่าความเข้มข้นในระดับที่ทำให้ปลาตายไปเป็นจำนวน 50 % (LC_{50}) ของจำนวนปลาทั้งหมด โดยนำค่าความเข้มข้นของสารละลายในช่วงแรกมาย่อยความเข้มข้นให้ละเอียดขึ้น ซึ่งแบ่งเป็น 5 ความเข้มข้นเช่นกัน ในการทดลองนำปลาใส่บีกเกอร์ทดลองบีกเกอร์ละ 10 ตัว (3 ซ้ำ) ทำการทดลอง 96 ชั่วโมง (4วัน) ตลอดระยะเวลาการทดลอง 4 วัน จะไม่มีการให้อาหาร

- **การเตรียมสารละลายเพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อปลาตะเพียนขาว**

ช่วงการทดสอบเบื้องต้น โดยชั่งสารตัวอย่าง 1.0 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติม 95 % ethanol 0.5 มล. แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixture หรือ เครื่อง Sonicate เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร สารละลายจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 1000.0 ppm ใช้เป็น stock solution จากนั้นทำการเจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้นเป็น 100, 10, 1 และ 0.1 ppm แล้วตวงสารละลายแต่ละความเข้มข้นใส่บีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ใบละ 500.0 มล. โดยมีชุดควบคุมตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นของ 95 % ethanol เท่ากับ 0.5 มล./ล ปริมาตร 500.0 มล. จำนวน 3 ซ้ำและมีชุดควบคุมปกติคือน้ำใช้เลี้ยงปลา 500 มล. อีก 3 ซ้ำ

ช่วงการทดสอบอย่างละเอียด โดยการนำค่าความเข้มข้นของสารละลายที่ทำให้ปลาตายไป 50% จากช่วงแรกมาทำการย่อยความเข้มข้นให้ถี่ขึ้นซึ่งแบ่งออกเป็น 5 ความเข้มข้นเช่นกัน และทำการทดลองเหมือนช่วงแรก

- **การทดสอบความเป็นพิษ** โดยช้อนปลาที่มีลักษณะแข็งแรงสมบูรณ์ขนาดใกล้เคียงกันใส่ลงในกาละมังขนาดใหญ่ แล้วทำการช้อนแบบสุ่มใส่ลงในขันพลาสติกที่มีน้ำอยู่แล้ว ขันละ 10 ตัว เอากระชอนช้อนปลารองที่ปากขันแล้วรินน้ำออกนำเฉพาะตัวปลาใส่บีกเกอร์ทดลองไล่ไปจนครบบีกเกอร์ทดลอง สังเกตอาการของปลาและนับจำนวนปลาตายที่ชั่วโมงที่ 0, 6, 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง โดยถือเกณฑ์การตัดสินการตายของปลาว่าจะต้องไม่มีการปิด - เปิด กระพุ้งแก้มและไม่แสดงอาการตอบสนองใด ๆ เมื่อใช้แท่งแก้วแตะเบา ๆ นำสัตว์ทดลองออกทันทีที่พบ นำค่าการตายสะสมของปลาที่ 96 ชั่วโมงไปคำนวณค่า LC_{50}ที่ 96 ชม. โดยโปรแกรมโพรบิท

- **การวิเคราะห์คุณภาพน้ำที่ใช้ทดลองทั้งก่อนและหลังทดลอง** เพื่อศึกษาสมบัติของน้ำต่อความเหมาะสมในการดำรงชีวิตของสัตว์ทดลอง รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงสมบัติของน้ำที่อาจเกิดขึ้น ได้แก่ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) โดยเครื่อง pH meter และค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) โดยเครื่องOxi-meter วัดอุณหภูมิของน้ำด้วยเทอร์โมมิเตอร์

3.7.3 **การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี** Paper disc diffusion (Larry M. และ Judy K., 1986)

- **การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย** โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค 3 ชนิด คือ *S. aureus*, *S. typhi* และ *P. aeruginosa* ซึ่งได้จากรับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลมหาสารคามมาเลี้ยงในอาหารเหลว tryptose broth (สำหรับ *S. aureus*), Mac Conkey broth (สำหรับ *S. typhi* และ *P. aeruginosa*) นาน 24 ชั่วโมง แล้วปรับให้มีความขุ่นเท่าหรือใกล้เคียงกับ MacFarland No. 0.5 ซึ่งผสมโดย 0.048 M. $BaCl_2$ 0.5 มล. กับกรดซัลฟุริก 99.5 มล. แล้วทำการ spread plate ด้วยแท่งแก้วเกลี่ยเชื้อบนอาหารที่ใช้ทดสอบความไว Mueller Hinto Medium (MHM)

- **การเตรียมแผ่นชุบสารทดสอบ** นำกระดาษ Paper discs ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร ซึ่งปราศจากเชื้อมาชุบสารละลายที่เตรียมโดยการนำสารตัวอย่างมาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆกัน เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารตัวอย่างในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย หรือ MIC (Minimum Inhibit Concentration) อย่างคร่าว ๆ แล้วนำแผ่น paper disc ที่ชุบสารแล้วไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้ง

- **การทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารตัวอย่าง** นำแผ่นที่เตรียมไว้มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบความไวซึ่งป้ายเชื้อไว้แล้ว แต่ละจานวางแผ่นชุบสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยมีแผ่นปฏิชีวนะเป็นตัวเปรียบเทียบ และมีแผ่นชุบตัวทำละลายเป็นตัวควบคุมนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสซึ่งเชื้อไม่เจริญ (inhibition zone) กว้างไม่ต่ำกว่า 6 มิลลิเมตร