บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องเขย่า (Shaker)
2. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)ของบริษัท Ta Chang Medical Instrument Factory, Taiching, Taiwan
3. เครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) รุ่น N-N series ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co.,LTD, Japan
4. แผ่นโครมาโตกราฟแบบผิวบางเคลือบด้วยซิลิกาเจล silica gel 60 F 254
5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น PP-50 ของบริษัท Sartorius, Germany
6. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BL610 ของบริษัท Satorius, Germany
7. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ larminar flow รุ่น BV 123 ของบริษัท ISSOC, Thailand
8. กล้องจุลทรรศน์รุ่น CH 30RF200 ของบริษัท Olympus, Japan
9. ตู้อบ (Oven) รุ่นClayson, New Zealand
10. อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer) ของบริษัท Brand, Germany
11. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas Chromatography) รุ่น 9A ของบริษัท Shimazu, Japan
12. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ของบริษัท Watesr, USA
13. เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ รุ่น Mecury 400 ของบริษัท Varian
14. เครื่องอบสารในสุญญากาศ ของบริษัท Buchi, Switzerland
15. เครื่องการวัดค่าการบิดระนาบแสง (polarimeter) รุ่น p-1010 ของบริษัท Jasco, Japan

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	บริษัท / ประเทศ
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-potassium hydrogen phosphate)	Carlo Erba reagent / Italy
ซิลิกาเจล (silica gel 60 Art.)	Merck / Germany
โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Sodium sulfate anhydrous)	Carlo Erba reagent / Italy
ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethysulfoxide)	Merck / Germany
โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)	Merck / Germany
ผงสกัดยีสต์ (Yeast extract)	Difco / USA.
ไดเอธิลอีเทอร์ (Diethyl ether)	Carlo Erba reagent / Italy
เอธิลอะซิเตต(Ethyl acetate)	Carlo Erba reagent / Italy
เฮกเซน (Hexane)	Carlo Erba reagent / Italy
เด็กโตรส (Dextrose)	Merck / Germany
ทวีน 80 (Tween 80)	Fluka / Switzerland
วุ้นผง (Agar)	Difco / USA.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

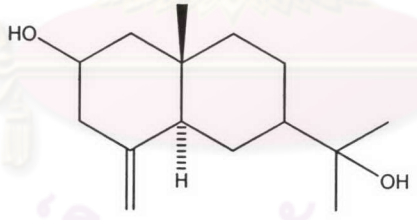
3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อ *Aspergillus nigr* 172, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เชื้อ *Fusarium oxyssporum, Phytophthora parasitica, Alternaria brassicicola, Colletotrichum capsici,* และ *Pythium deliense* จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

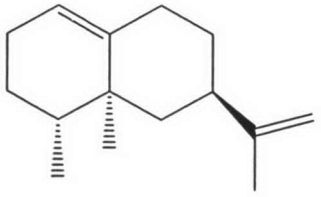
3.4 สารตั้งต้น

Pterocarpol สกัดได้จากส่วนลำต้นของประดู่ (*Pterocarpus macrocarpus)* โดยนำเนื้อไม้ประดู่แห้งมาบดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปแช่ในเฮกเซนเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการกรองเอาส่วนที่เป็นเฮกเซนมาระเหยจนเหลือปริมาตร 1 ใน 3 ของสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ 1 คืนจะมีผลึกเกิดขึ้น ทำการกรองผลึกที่ได้ด้วยกระดาษกรอง นำผลึกที่ได้มาตกตะกอนซ้ำ เพื่อให้มีตะกอนมีความบริสุทธิ์มากขึ้น จากเนื้อไม้ประดู่แห้งพบว่า ไม้ประดู่แห้งหนัก 3 กิโลกรัม เมื่อทำการสกัดจะได้ผลึกสีขาว 0.51 กรัม คิดเป็น 1.70 x 10-2 %Yield โดยมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 254 สูตรโมเลกุลคือ $C_{15}H_{26}O_2$ และโครงสร้างทางเคมีแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 12 โครงสร้างทางเคมีของ (+)-Pterocarpol (Gianluca คณะ, 1981)

Valencene จาก บริษัท Fuka มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 204 สูตรโมเลกุลคือ $C_{15}H_{24}$ และโครงสร้างทางเคมีแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 โครงสร้างทางเคมีของ (+)-Valencene (Hiroshi, 2005)

3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย

1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญเติบโตของ *Aspergillus niger*

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทำการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) แล้วทำการเขี่ยเส้นใยของเชื้อรามาส่องดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อโดยเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร Soybean Meal Glucose (SMG) (Hoffmann และ Punnapayak, 1988) โดยการเตรียมสปอร์แขวนลอยของ *Aspergillus niger* ใน 1% tween 80 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วทำการนับจำนวนสปอร์โดยใช้ Haemacytometer แล้วปรับจำนวนให้ได้ 2.5×10^{6}- 2.5×10^{7} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการถ่ายสปอร์ที่เตรียมได้จำนวน 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ทำการหาน้ำหนักแห้งทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 15 วัน โดยนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ เพื่อหาน้ำหนักแห้งของเชื้อรา นำน้ำหนักแห้งที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งกับระยะเวลาการบ่ม

2. การเลี้ยงจุลินทรีย์

เขี่ยสปอร์ของเชื้อราจากอาหารแข็งเอียงลงใน 1 % tween 80 ในน้ำกลั่น เพื่อทำสปอร์แขวนลอยโดยเขี่ยให้สปอร์ของรากระจายตัวใน 1 % tween 80 ทำการนับสปอร์โดยใช้ Haemacytometer แล้วปรับจำนวนให้ได้ 2.5×10^{6}- 2.5×10^{7} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการถ่ายสปอร์ที่เตรียมได้จำนวน 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวสูตร SMG ปริมาตร 50 มิลิลิตรสำหรับเตรียมหัวเชื้อ นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างด้วยวิธีทางชีวภาพ

นำหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลวสูตร SMG ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารตั้งต้นซึ่งละลายในไดเมธิลซัลฟอกไซด์ นำไปเขย่าที่สภาวะเดิม

4. หาสภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนรูปสารตั้งต้น

ทำการศึกษาถึงอิทธิพลของความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมโดยเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 30 20 10 และ 5 มิลลิกรัมต่ออาหารเหลว 50 มิลลิลิตรตามลำดับสำหรับ pterocarpol ในส่วนของ

valencene ใช้ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม ต่ออาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ทำการเก็บเชื้อทุกวันที่ 1 3 5 และ 7 มาหาผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC และหาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี

5. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของ *A. niger* ในสภาวะปกติ กับเมื่อใส่สารตั้งต้น

โดยทำการเก็บเชื้อตามข้อที่ 5 โดยให้วันที่ใส่สารตั้งต้นเป็นวันที่ 0 ภายหลังจากใส่สารตั้งต้น 24 ชั่วโมงเป็นวันที่ 1 เทียบกับการเจริญของเชื้อเมื่อไม่ใส่สารตั้งต้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ มาทำการหาน้ำหนักแห้งตามวิธีในข้อ 1 นำน้ำหนักแห้งที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น

6.การสกัดแยกผลิตภัณฑ์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อราที่เตรียมได้ในข้อ 4 มาทำการกรองเก็บส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำการสกัดด้วยไดเอธิลอีเทอร์ในอัตราส่วน 1 : 1 ทำการสกัดทั้งหมด 3 ครั้ง เก็บส่วนของไดเอธิลอีเทอร์มาทำการระเหยจนแห้งโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศแบบหมุน และทำการขจัดน้ำออกด้วยการเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส นำสารที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค TLC และทำการชั่งหาน้ำหนักของสารที่ได้

7. การวิเคราะห์สารที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิคธินเลเยอร์โครมาโททกราฟฟี (Thin Layer Chromatography)

หยดสารที่ได้จากการสกัดบนแผ่นธินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี (TLC aluminum sheet silica gel 60 F 254) รอให้สารที่หยดแห้ง จากนั้นนำไปวางที่โถแก้วที่บรรจุด้วยตัวทำละลาย โดยให้ตำแหน่งเริ่มต้นที่หยดสารอยู่เหนือระดับตัวทำละลาย ปิดฝาให้สนิท รอให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปจนถึงแนวของตัวทำละลาย จากนั้นนำแผ่นซิลิกาออกจากโถแก้ว ตรวจสอบตำแหน่งของสารที่ปรากฏเมื่อจุ่มในกรดซัลฟูริก 5% ในเอธทานอลและให้ความร้อน วัดระยะทางในการเคลื่อนที่ของสาร พร้อมทั้งหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Ratio of front (R_f)) แสดงในภาคผนวก ข

8. การวิเคราะห์สารที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟฟี (Gas Chromatography)

ทำการการวิเคราะห์สารที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟฟี โดยนำสารตัวอย่างมาละลายในไดเอทธิลอีเทอร์ฉีดเข้าสู่ เครื่อง GC model 9A ใช้คอลัมน์ชนิด HP-5 (0.25×30 มิลลิเมตร)ใช้ไนโตรเจนเป็นแก๊สพาโดยใช้อุณหภูมิ injector และ detector เป็น 220 องศา

เซลเซียส ใช้อุณหภูมิของ column เป็นแบบเพิ่มขึ้นขณะวิเคราะห์ (program temperature) คือ อุณหภูมิเริ่มต้น (initial temperature) 100 °C เวลา (initial time) 1 นาที อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ (program rate) 10°C ต่อนาที อุณหภูมิสุดท้าย (final temperature) 200 °C เวลา 4 นาที

9. การทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี (Column Chromatography)

นำซิลิกาเจล (silica gel 60 Art.) ของบริษัท Merk หนักประมาณ 20 เท่าของน้ำหนักสารที่ต้องการแยกมาแช่ในเฮกเซนกวนให้เข้ากัน ค่อยๆบรรจุซิลิกาเจลลงในคอลัมน์แก้วรอให้ซิลิกาเจลเรียงตัวในคอลัมน์จนกระทั่งไม่มีการยุบตัวของผิวซิลิกาเจล จากนั้นชะคอลัมน์โดยการผ่านตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ในการแช่ซิลิกาเจล

นำสารที่แยกได้ในข้อ 6 มาบรรจุลงในคอลัมน์ที่เตรียมได้แล้วชะด้วยระบบตัวทำละลายอย่างต่อเนื่อง โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เฮกเซน- เอธิลอะซิเตต โดยปรับปริมาณตัวทำละลายแต่ละชนิดเพื่อเพิ่มสภาพขั้วของระบบตัวทำละลาย เก็บสารที่ผ่านคอลัมน์โดยใช้หลอดแก้ว นำสารที่เก็บได้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิคธินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี จากนั้นรวมสารที่มีระยะการเคลื่อนที่ตรงกันเข้าไว้ด้วยกันแล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศแบบหมุน แล้วหาน้ำหนักแห้งของสารแต่ละตัว โดยการคำนวณเป็นร้อยละโดยน้ำหนักของผลิตภัณฑ์เทียบกับสารตั้งต้น

10. การทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

นำสารที่ได้จากการผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีมาทำการแยกให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้โครมาโทกราฟฟีเฟสผันกลับ (reversed-phase chromatography) โดยใช้คอลัมน์ชนิด cosmosil 5C 18-AR-II (10×250 มิลลิเมตร)ใช้เมทานอลและน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่อัตราส่วน 65 ต่อ 35 ตามลำดับ อัตราการไหลเท่ากับ 2.8 มิลลิลิตรต่อนาที

11. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้นกับปริมาณสารตั้งต้นที่หายไปเมื่อเวลาผ่านไป

ทำการคำนวณหาร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยคิดเป็นร้อยละของปริมาณผลิตภัณฑ์ (% yield) เกิดขึ้นเทียบกับปริมาณสารตั้งต้นเริ่มแรก ส่วนปริมาณของสารตั้งต้นที่หายไป คิดเป็นร้อยละของการมาปรากฏของสารตั้งต้น (%disappear) คือร้อยละของสารตั้งต้นที่หายไปภายหลังการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเมื่อเทียบกับปริมาณสารตั้งต้นเริ่มแรก เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

12. การตรวจสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์

12.1 ตรวจสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ โดยใช้วิธีวัดเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (%growth inhibition) วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ข โดยใช้เชื้อทดสอบคือ *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* โดยละลายสารทดสอบในไดเมธิลซัลฟอกไซด์ ทำการผสมสารทดสอบลงในอาหารเหลวสูตร NA ทดสอบที่ความเข้มข้น 3.5 โมลาห์ โดยให้หลอดที่ใส่ไดเมธิลซัลฟอกไซด์เป็นชุดควบคุม โดยใส่เชื้อที่จะทดสอบลงในอาหารเหลวให้ได้ความเข้มข้น 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตรทำการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบเมื่อเชื้อเจริญเป็นเวลา 4 ชั่วโมงโดยการนับจำนวนเซลล์โดยใช้ Haemacytometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และทำการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต

12.2 ตรวจสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ โดยใช้วิธีวัดเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (%growth inhibition) วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวกโดยใช้เชื้อทดสอบคือ *Aspergillus niger, A. flavus, A. fumigatus, Fusarium oxyspora, Phytophthora parasitica, Alternaria brassicicola, Colletotrichum capsici,* และ *Pythium deliense* สารทดสอบละลายใน ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ ทำการผสมสารทดสอบลงในอาหารสูตร PDA ขณะที่อาหารยังคงเหลวอยู่ ทดสอบที่ความเข้มข้น 3.5 โมลาห์ โดยให้เพลทที่ใส่ไดเมธิลซัลฟอกไซด์เป็นชุดควบคุม โดยเจาะเชื้อที่จะทดสอบลงตรงกลางเพลทที่มีสารทดสอบ ทำการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบเมื่อเชื้อของเพลทในชุดควบคุมเจริญเต็ม ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และทำการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต

13. การวิเคราะห์โครงสร้างผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคสเปกโทสโกปี

13.1 ทำการวิเคราะห์หาการบิดระนาบแสงของผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่อง polarimeter รุ่น P1010 โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย

13.2 ทำการวิเคราะห์โครงสร้างของผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคโปรตอน และคาร์บอน 13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกทรา ทั้ง 1 มิติ และ 2 มิติ

สรุปแผนการทดลองแสดงในภาพที่ 14 และ 15

เลี้ยงเชื้อรา *A.niger* บนอาหารเหลวสูตร SMG

↓

ไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน

↓

สกัดแยกผลิตภัณฑ์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

↓

วิเคราะห์สารที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค TLC และ GC

รูปที่ 14 แผนผังแสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ valencene ด้วย *A. niger*

เลี้ยงเชื้อรา *A.niger* บนอาหารเหลวสูตร SMG

↓

หาภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนรูปสารตั้ง
(ความเข้มข้นของสารตั้งต้น และระยะเวลาในการบ่ม)

ไบโอทรานส์ฟอร์เมชัน

↓

สกัดแยกผลิตภัณฑ์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

↓

วิเคราะห์สารที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค TLC

↓

ทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี และ เทคนิค HPLC

↓

วิเคราะห์หาโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ด้วเทคนิค NMR

↓

ตรวจสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเทียบกับสารตั้งต้น

รูปที่ 15 แผนผังแสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ pterocarpol ด้วย *A. niger*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย