สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Fisher-John Melting Point Apparatus)

สำหรับการหาจุดหลอมเหลวใช้เครื่อง Fisher-John Melting Point Apparatus ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำได้โดยนำสารตัวอย่างมาบดให้ละเอียด จากนั้นบรรจุลงในหลอดแก้วสำหรับตรวจหาจุดหลอมเหลว (capillary tube) ให้ได้ความสูงพอประมาณ แล้วนำไปหาจุดหลอมเหลวด้วยเครื่องวัดจุดหลอมเหลว

3.1.2 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR)

เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR) ของบริษัท Nicolet Impact รุ่น 410 สำหรับวัดอินฟราเรดสเปกตราของสาร สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยบดผสมกับโปแตสเซียมโบรไมด์ (KBr) อัดเป็นแผ่น (pellet) เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร หนาประมาณ 1 มิลลิเมตร

3.1.3 Mass Spectrometer (MS)

สำหรับใช้ในการหามวลโมเลกุลของสารประกอบวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High resolution electrospay true of flight (HRES/TOF) Mass Spectrometer รุ่น LCT บริษัท Micromass UK Limited

3.1.4 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR)

เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR) รุ่น Varian Mercury 400 NMR สำหรับการหาโปรตอนและคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรา โดยวัดค่าเคมิคอลชิฟท์เป็นพีพีเอ็ม (ppm) สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยละลายในคลอโรฟอร์ม-ดี ($CDCl_3$), เมธานอล-ดี$_4$ (CD_3OD), ดิวเทอร์เรียมออกไซด์ (D_2O) และไดเมธิลซัลฟอกไซด์- d_6 (DMSO-d_6) ^{1}H-NMR สเปกตรัมวิเคราะห์ที่ 400 MHz สำหรับ ^{1}H nuclei โดยอ้างอิงกับค่าเคมิคอลชิฟท์ของตัวทำละลายที่เหลืออยู่ ค่าเคมิคอลชิฟท์ (δ) 7.26 ppm สำหรับ $CDCl_3$, 2.50 ppm สำหรับ DMSO-d_6, 4.87 ppm สำหรับ MeOH-d$_4$ และ 4.80 ppm สำหรับ D_2O และวิเคราะห์ ^{13}C-NMR ที่ 100 MHz สำหรับ ^{13}C nuclei มีค่าเคมิคอลชิฟท์ (δ) 77.1 ppm

T 224457 55

3.1.5 Rotary Vacuum Evaporator

เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) ของบริษัท Buchi ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.1.6 Specific Optical Rotation

Polarimeter รุ่น 341 โดยใช้ sodium lamp ที่ความยาวคลื่น 589 นาโนเมตร ของบริษัท Perkin-Elmer

3.1.7 Ultraviolet-visible Spectrophotometer (UV-VIS)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Varian Cary 50 Probe ทำได้โดยนำสารที่ต้องการวัดมาละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่สารนั้นละลายได้ดี แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.1.8 CombiFlash Graduate

เครื่อง Isco CombiFlash™ Graduate™ ของบริษัท Isco ใช้แยกสารตัวอย่างโดยใช้ flash chromatography โดยมีอัตราเร็วระหว่าง 10-100 มิลลิเมตร/นาที โดยใช้คอลัมน์ขนาด 30 × 2.5 เซนติเมตร บรรจุตัวดูดซับซิลิกาเจล Silica gel 60 No. 109385.1000 หรือ Sephadex LH-20 ลงในคอลัมน์ขนาดต่างๆ ซึ่งเครื่องนี้จะมีปั๊มช่วย ทำให้ตัวทำละลายไหลได้เร็วขึ้น

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 ตัวทำละลายอินทรีย์

ตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลองเป็นตัวทำละลาย Commercial Grade และ Analytical Grade แต่สำหรับตัวทำละลาย Commercial Grade นั้น จะต้องทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่นก่อนนำมาใช้ทุกครั้ง ตัวทำละลายที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, ไดคลอโรมีเธน, เอธิลอะซิเตต, เมธานอล, แอซิโตน, บิวทานอล และ เอธานอล

3.2.2 สารเคมีชนิดอื่นๆ

1. ตัวดูดซับใช้ซิลิกาเจล Silica gel 60 No. 109385.1000 (230-400 Mesh ASTM) (E.Merck)

2. แผ่นธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography) สำเร็จรูปชนิด Art. 5554 TLC Aluminium sheets Silica gel $60F_{254}$ (1.05554.0001) ของบริษัท Merck, Damstadt ประเทศเยอรมนี

3. Sephadex LH-20 ของบริษัท Pharmacia Biotech AB. ประเทศสวีเดน

3.3 เทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 ธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC)

ใช้แผ่น TLC สำเร็จรูปแต้มสารด้วยหลอดรูเล็ก (Capillary tube) แล้วทำให้เกิดการแยก (develop) ในขวดแก้วปล่อยให้วัฏภาคเคลื่อนที่เคลื่อนไปจนถึงแนวเส้นตัวทำละลาย (solvent front) ทำให้แห้ง จากนั้นนำไปตรวจหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC โดยส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร หรือโดยใช้รีเอเจนต์ Vanillin/H_2SO_4 (ซึ่งประกอบด้วย วานิลิน 0.50 กรัม, เอธานอล 95 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 4.5 มิลลิลิตร) หรือโดยใช้ Ninhydrin (20 % Ninhydrin ในเอธานอล) พอให้สารซึมเข้าแผ่น TLC จนทั่ว แล้วนำแผ่น TLC ไปให้ความร้อนจนปรากฏจุดของสารขึ้นบนแผ่น TLC

3.3.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

บรรจุตัวดูดซับซิลิกาเจล Silica gel 60 No. 109385.1000 หรือ Sephadex LH-20 ลงในคอลัมน์ขนาดต่างๆ ซึ่งวิธีนี้จะใช้ปั๊มช่วย เพื่อให้ตัวทำละลายไหลได้เร็วขึ้น

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง (ดูรายละเอียดสูตรอาหารในตารางที่ 3.1 ภาคผนวก ก)

3.5 การเก็บตัวอย่างใบพลูดาว

เก็บตัวอย่างใบพลูดาวจาก 4 จังหวัดในประเทศไทย คือ จังหวัดเชียงใหม่ (รหัส 50) จังหวัดเชียงราย (รหัส 57) จังหวัดราชบุรี (รหัส 70) และจังหวัดนครปฐม (รหัส 73) โดยเลือกเก็บตัวอย่างจากต้นพลูดาวที่มีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรงไม่เป็นโรค ในช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2547 นำใบพลูดาวที่ได้เก็บใส่ถุงพลาสติกที่แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะนำมาแยกราเอนโดไฟต์

3.6 การแยกราเอนโดไฟต์

นำใบพลูดาวที่เก็บมาทำการแยกราเอนโดไฟต์โดยใช้เทคนิค surface sterilization ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Petrini (Petrini, 1986) ดังนี้

1. นำใบพลูดาวล้างน้ำทำความสะอาดโดยเปิดให้น้ำไหลผ่านจากนั้นเจาะเป็นวงกลมให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร แล้วแช่ในเอธานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที และสุดท้ายแช่ในเอธานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ อีก 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วซับให้แห้งบนกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว

2. นำส่วนใบพลูดาวที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 °C) แล้วสังเกตการงอกของเส้นใยของราออกมาจากบริเวณริมขอบของใบเนื้อเยื่อส่วนใบพลูดาวทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

3. เมื่อพบว่ามีเส้นใยของราเอนโดไฟต์เจริญออกมาจากขอบชิ้นส่วนของส่วนใบพลูดาว จึงเขี่ยส่วนปลายเส้นใยของรานำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ใหม่ ทำเช่นนี้หลายหนจนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ตรวจสอบความบริสุทธิ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วเก็บรักษาราเอนโดไฟต์เป็น stock เชื้อไว้ (ข้อ 3.6 ภาคผนวก ก)

3.7 การคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

นำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์

3.7.1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์

นำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ CMA (Corn Meal Agar), MEA (Malt Extract Agar), PDA (Potato Dextrose Agar), SDA (Sabouraud Dextrose Agar) และ YEA (Yeast Extract Sucrose Agar) เป็นเวลา 14 วัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นตัดชิ้นวุ้นของราขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร ทำ 2 ซ้ำ ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยการสังเกตุวงใสที่เกิดขึ้น (ภาคผนวก ก)

3.7.2 การทดสอบโดยวิธี Agar diffusion

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA สำหรับแบคทีเรีย และ YMA สำหรับยีสต์ จากนั้นนำไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาจุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และนำมาป้าย (swab) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 3 ครั้งให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยในแต่ละครั้งจะทำการหมุนจานเลี้ยงเชื้อไปประมาณ 60 องศา เพื่อให้จุลินทรีย์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำชิ้นวุ้นของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ต้องการทดสอบมาวางทับลงบนอาหารแข็ง นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้ววัดวงใสที่เกิดขึ้น จากนั้นทำการคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีที่สุด แล้วนำราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีอย่างคร่าวๆ โดยใช้เทคนิคทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) และ NMR

3.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเอนโดไฟต์

3.8.1 การพิสูจน์ทางสัณฐานวิทยา

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ 50MLY-5 โดยเพาะเลี้ยงราบนอาหารแข็งที่แตกต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ CMA, MEA, PDA, SDA และ YEA บ่มราที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 เดือน เพื่อศึกษาลักษณะต่างๆ เช่น ลักษณะของโคโลนีหรือสีของเส้นใย และสปอร์ภายใต้กล้อง จากนั้นนำมาทำ slide culture เทคนิค ย้อมด้วย lactophenol blue เพื่อดูการการสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.8.2 การทำ slide culture

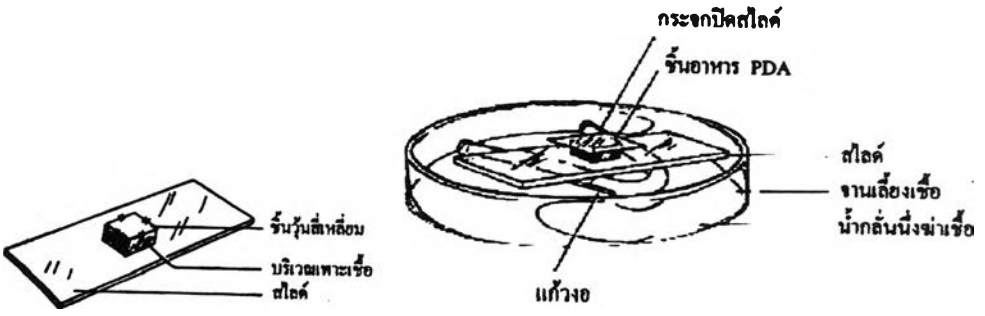
การทำ slide culture (รูปที่ 3.1) เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใย สปอร์ ก้านชูสปอร์ และลักษณะอื่นๆ ของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งมีวิธีการทำดังนี้

1. นำกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ววางลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อจากนั้นวางแท่งแก้วรูปตัววีหรือหลอดดูดน้ำที่มีความยาวพอเหมาะ 2 แท่ง ที่ทำการอบฆ่าเชื้อแล้วทับบนกระดาษกรอง จากนั้นวางแผ่นสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงบนแท่งแก้วหรือหลอดดูดน้ำ

2. ตัดชิ้นวุ้นขนาดประมาณ 1×1×0.3 ตารางเซนติเมตร วางลงบนแผ่นสไลด์ แล้วทำการเขี่ยเชื้อราที่ต้องการทดสอบใส่ลงที่ด้านข้างของชิ้นวุ้นทั้ง 4 ด้าน จากนั้นปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ฆ่าเชื้อ โดยการจุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนไฟ

3. เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในจานเพาะเชื้อพอให้ชุ่มกระดาษกรองหรือผ้าก๊อช ปิดฝาจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วันหรือจนกว่าเชื้อราจะเจริญเต็มที่สังเกตการเจริญของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกวัน

4. ตรวจสอบลักษณะโครงสร้างของสปอร์ โดยการหยดสีย้อมแลคโตฟีนอลคอตตอนบลู (Lactophenol Cotton Blue) ลงบนแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ที่เส้นใยของราเจริญอยู่ นำไปศึกษาลักษณะเส้นใยของสปอร์ หรือลักษณะอื่นๆ ของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทาขอบสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บเพื่อป้องกันสีย้อมแห้งหากเก็บไว้ศึกษาต่อไป



รูปที่ 3.1 วิธีการทำ Slide Culture

3.8.3 การพิสูจน์ทางอณูชีววิทยา

เป็นการพิสูจน์เอกลักษณ์ของราโดยการวิเคราะห์ลำดับ DNA ของส่วน ITS ของ ribosomal RNA ทำได้โดยการเลี้ยงราเอนโดไฟต์ 50MLY-5 ในอาหาร PDB จากนั้นสกัด DNA จากเส้นใยตามวิธีการของ White (White,T.J., 1990) แล้วนำทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) โดยใช้ Primers ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) และ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) จากนั้นนำมาเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ ITS1-5.8-ITS2 regions จาก DNA ทั้งหมดที่สกัดได้ แล้วเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย thermal cycle program (ปฏิกิริยาเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาซ้ำ จำนวน 30 รอบ

ข้อมูลลำดับเบสของ DNA ที่ได้นำไปเปรียบเทียบความเหมือนของสาย DNA บริเวณ Primers ITS5 และ ITS4 BLASTN 2.2.10 (Altschul, S.F., 1997) กับข้อมูลลำดับเบสของราสายพันธุ์ต่างๆ จาก GenBank DNA database ด้วยโปรแกรม ClustalW (1.82) multiple sequence alignment program (Thompson, J.D., 1994)

3.9 การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของราเอนโดไฟต์ 50MLY-5

3.9.1 การศึกษาการสร้างสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จากราเอนโดไฟต์ 50MLY-5

นำราเอนโดไฟต์ 50MLY-5 ที่คัดเลือกได้ (เนื่องจากมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดจากการทดลองดังกล่าวข้างต้น) นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง YEA นาน 20 วัน ที่อุณหภูมิห้อง นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว YEB เป็นจำนวน 10 ลิตร โดยแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใส่แต่ละขวดให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร เจาะชิ้นวุ้นที่มีราขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร จำนวน 5 ชิ้น โดยแต่ละชิ้นมีขนาดเท่าๆกัน ลงในแต่ละขวด นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง

เป็นระยะเวลา 1 เดือน เก็บตัวอย่างราทุก 2 วัน อย่างละ 3 ซ้ำ นำมากรองแยกส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงรา จากนั้นนำส่วนเส้นใยราไปอบที่อุณหภูมิ 70 °C แล้วชั่งน้ำหนักแห้งจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ เขียนกราฟอัตราการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์ 50MLY-5 ระหว่างน้ำหนักแห้ง(กรัม) และระยะเวลาการเจริญเติบโตของรา (วัน)

3.9.2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์

เตรียมราเอนโดไฟต์ 50MLY-5 ให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YEB (เนื่องจากรามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อดีที่สุดในอาหารชนิดนี้จากการทดสอบในอาหารแข็งข้างต้น) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน โดยนำอาหารเลี้ยงรา 50 MLY-5 มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แยกส่วนของเส้นใยราและน้ำเลี้ยงรา ออกจากกัน แล้วนำส่วนของน้ำเลี้ยงรามาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Agar-well Diffusion Method (Jorgensen, J.H., 1999) เพื่อศึกษาว่าระยะเวลาใดที่ราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือ เจาะรูอาหารเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.7.1.3 และ 3.7.1.4 (ภาคผนวก ก) โดยใช้ sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7 มิลลิเมตร ใช้เข็มเขี่ยชิ้นวุ้นทิ้งในน้ำยาฆ่าเชื้อ หยอดน้ำเลี้ยงราที่จะทดสอบหาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ลงในหลุมที่เจาะไว้ด้วย micropipette หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำ 2 ซ้ำ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารแพร่เข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อน จากนั้นนำไปบ่มต่อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดผลการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้ โดยวัดโซนใสที่เกิดขึ้นรอบๆ รูที่เจาะไว้ จากขอบด้านหนึ่งถึงอีกด้านหนึ่ง หาค่าเฉลี่ย แล้วบันทึกผล

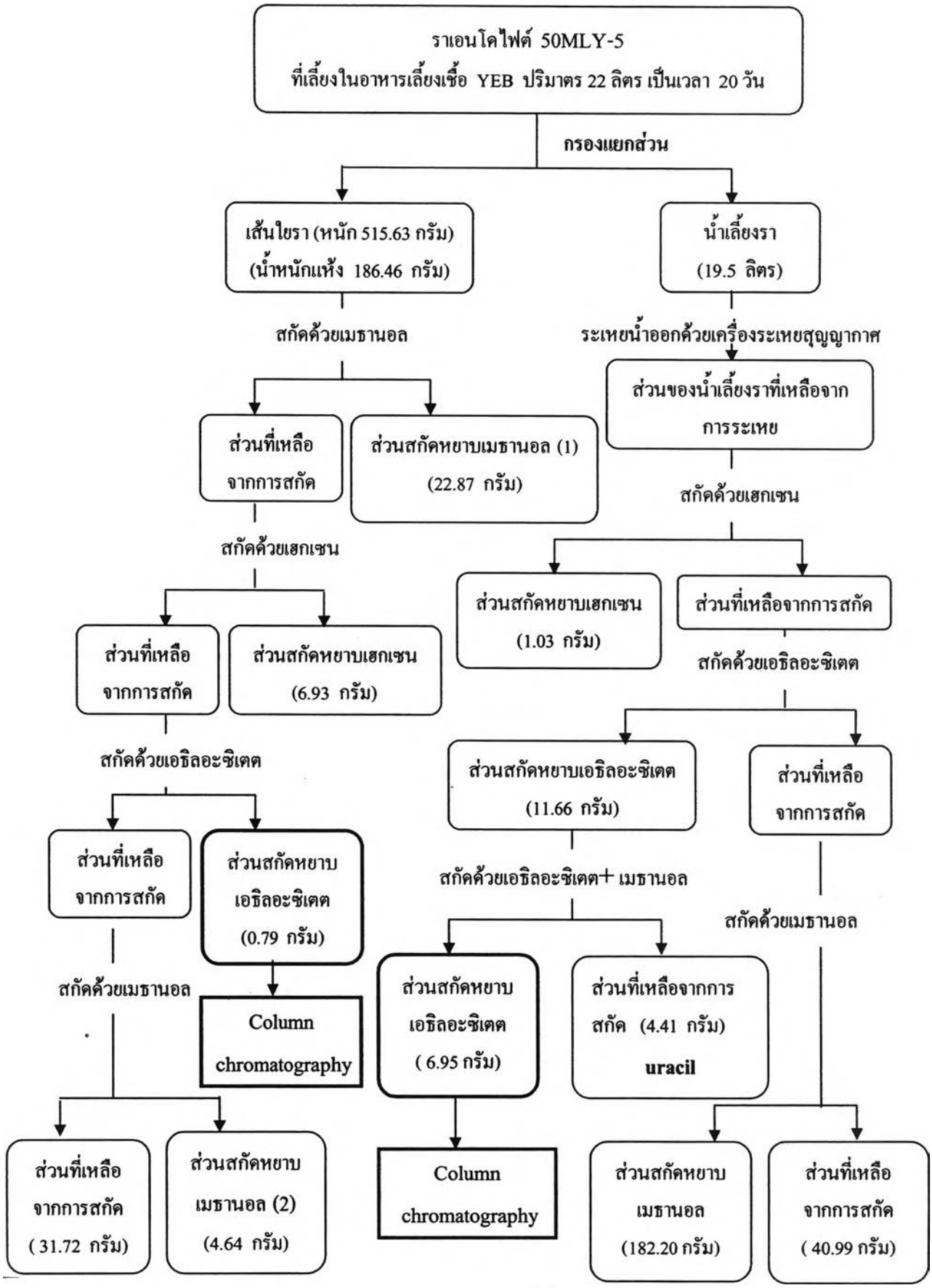
3.10 การสกัดและการแยกสารประกอบของสารสกัดที่ได้จากราเอนโดไฟต์ 50MLY-5

3.10.1 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ 50MLY-5

ใช้ sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7 มิลลิเมตร เจาะเอาชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของราเอนโดไฟต์ 50MLY-5 อายุ 20 วัน ที่เจริญอยู่บนอาหารแข็ง YEA มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ชิ้นต่อ 1 ขวด เลี้ยงทั้งหมดปริมาตร 22 ลิตร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน

3.10.2 การแยกสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ 50MLY-5

นำราเอนโดไฟต์ 50MLY-5 ที่เพาะเลี้ยงไว้ในข้อ 3.10.1 มาทำการกรองแยกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ซึ่งจะได้ส่วนของเส้นใยราและส่วนของน้ำเลี้ยงรา แล้วนำทั้ง 2 ส่วนที่แยกได้นี้มาสกัดต่อด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอธิลอะซิเตด และเมธานอล ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 3.1 ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้



แผนภาพที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารจากเส้นใยและน้ำลี้ยงราเอนโดไฟต์ 50MLY-5

3.11 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของส่วนสกัดหยาบที่ได้จากราเอนโดไฟต์ 50MLY-5 โดยใช้วิธี Paper disk diffusion method (Weaver และคณะ, 1994 และ Joseph และ คณะ, 1998)

ก. <u>การเตรียมตัวอย่างทดสอบ</u>

นำส่วนสกัดหยาบทั้ง 8 ส่วนที่ได้จากการสกัดลำดับส่วนคือ ส่วนสกัดหยาบเมธานอล ส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตต ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน และ ส่วนที่เหลือจากการสกัดของน้ำเลี้ยงรา ส่วนสกัดหยาบเมธานอล ส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตต ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน และ ส่วนที่เหลือจากการสกัดของเส้นใย มาตัวอย่างละ 20.0 มิลลิกรัม ผสมกับตัวทำละลาย 10% DMSO ในน้ำปริมาตร 1 ml จะได้สารละลายที่ความเข้มข้น 20.0 mg/ml แล้วนำไปเจือจางต่อด้วยตัวทำละลายให้ได้ระดับความเข้มข้น 10.0 mg/ml และ 5 mg/ml ตามลำดับ

ข. <u>การเตรียมสารละลายสารชุดควบคุม</u>

<u>ชุดควบคุมบวก</u> (Positive Control) ได้แก่

- สารละลาย Pennicillin G 10 µg/10 µl
- สารละลาย Streptomycin 10 µg/10 µl
- สารละลาย Ketoconazole 10 µg/10 µl

<u>ชุดควบคุมลบ</u> (Negative Control) ได้แก่

- ตัวทำละลาย 10% DMSO ในน้ำ

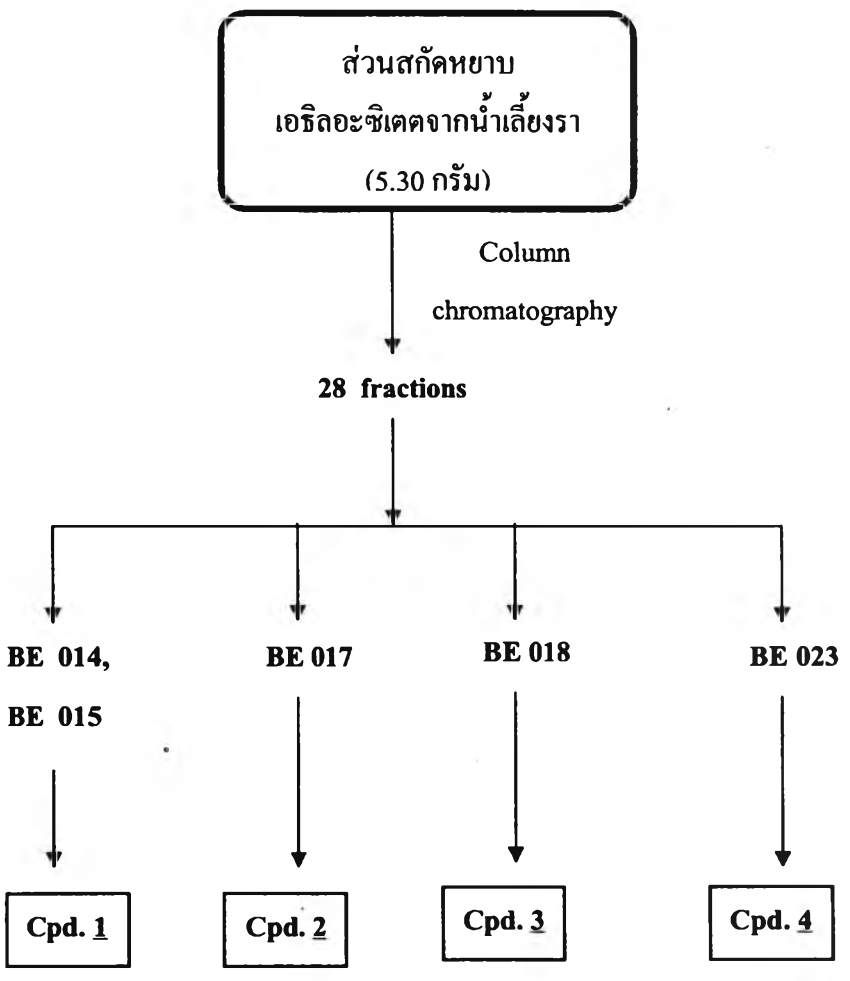
นำส่วนสกัดที่ได้จากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราราเอนโดไฟต์ทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์หยดลงบน paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร (อบฆ่าเชื้อแล้ว) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ ซึ่งวิธีการเตรียมจุลินทรีย์เหมือนกับข้อ 3.7.1.1-3.7.1.4 (ภาคผนวก ก) โดยแบคทีเรียบ่มนาน 18-24 ชั่วโมงส่วนยีสต์บ่มนาน 48 ชั่วโมง

นอกจากนั้นยังได้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งราก่อโรคพืช 4 ชนิด *Phytoptora palmivola*, *Alternalia brasiicola*, *Collectotrichum gloeosporiodides* และ *Fusarium oxysporum.* โดยเลี้ยงเชื้อราในอาหาร PDA ให้มีอายุ 4 วัน จากนั้นนำส่วนสกัดจากราเอนโดไฟต์มาละลายใน 10 % DMSO ในน้ำ (negative control) แล้วหยดลงบน paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร (อบฆ่าเชื้อแล้ว) ความเข้มข้นเหมือน 3.11 ก. ทำทั้งหมด 2 ซ้ำ โดยใช้ Captane, Iprodine และ Ketokonazole ความเข้มข้น10 µg เป็น Positive control นำไปบ่ม 2 วันที่อุณหภูมิห้อง แล้วอ่านผลการทดลอง

3.12 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราราเอนโดไฟต์ 50MLY-5 ให้บริสุทธิ์และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

3.12.1 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากน้ำเลี้ยงรา

นำส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากน้ำเลี้ยงรา น้ำหนัก 11.66 กรัม มาทำ partition ด้วยเมธานอล ได้สารสกัดหยาบ 6.95 กรัม และส่วนตะกอนที่ไม่ละลายในเมธานอลปริมาณ 4.41 กรัม จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบมาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ปริมาณ 5.30 กรัม โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (320 กรัม) โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 เซนติเมตร สูง 80.0 เซนติเมตร ตัวชะที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน-ไดคลอโรมีเธน, ไดคลอโรมีเธน, ไดคลอโรมีเธน-เมธานอล และเมธานอล ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.9



แผนภาพที่ 3.2 แสดงขั้นตอนการแยกสารจากส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ 50MLY-5 ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี

3.12.1.1 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของลำดับส่วนที่ 373-428 (BE 014-015)

สารประกอบ 1 ได้จากลำดับส่วนที่ BE 014-015 ของสารสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากน้ำเลี้ยง ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธนเป็นตัวชะจะได้ครูดสีเหลืองปนของแข็งสีขาว น้ำหนัก 215.3 มิลลิกรัม จากนั้นนำมาล้างน้ำมันสีเหลืองออกด้วยเฮกเซน แล้วนำไปตกผลึกซ้ำด้วยตัวทำละลายผสมเฮกเซน-ไดคลอโรมีเธน จะได้ผลึกสีขาวหนัก 44.33 มิลลิกรัม (0.20 % w/v) ซึ่งสามารถละลายได้ในคลอโรฟอร์ม

3.12.1.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของลำดับส่วนที่ 530-736 (BE 017)

สารประกอบ 2 ได้จากลำดับส่วนที่ BE017 ของสารสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากน้ำเลี้ยงรา ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ 2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธนเป็นตัวชะ จากนั้นนำมาลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีอีกครั้งโดยใช้ CombiFlash Graduate ใช้100% ไดคลอโรมีเธน-เมธานอลเป็นตัวชะ พบว่าส่วนที่ 129-132 โดยใช้ 5 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธนเป็นตัวชะ มีผลึกสีขาวปนกับน้ำมันสีส้ม จากนั้นล้างน้ำมันสีส้มออกด้วยไดคลอโรมีเธนและเมธานอลแล้วกรองแยกผลึกออกมา แล้วนำมาตกผลึกซ้ำด้วยตัวทำละลายผสมไดคลอโรมีเธน-เมธานอล ได้ผลึกสีขาวหนัก 21.2 มิลลิกรัม (0.096%) ละลายได้ในดิวเทอร์เรียมออกไซด์

3.12.1.3 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของลำดับส่วนที่ 737-900 (BE 018)

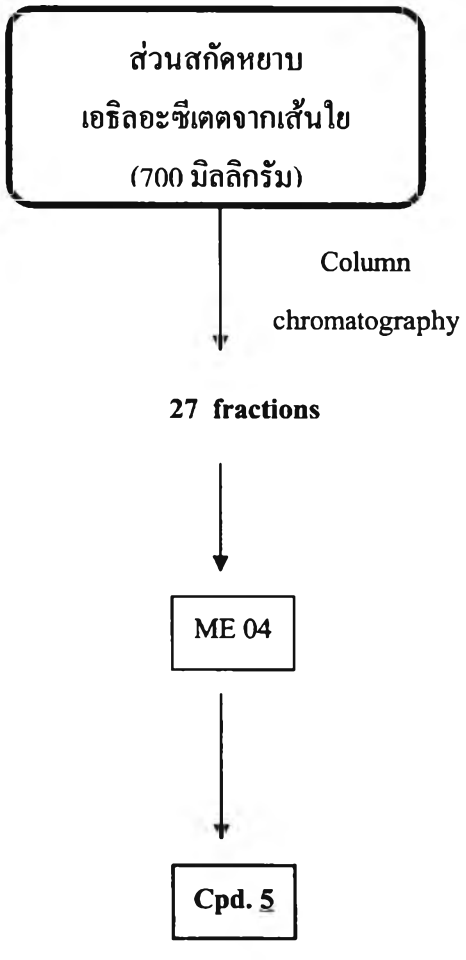
สารประกอบ 3 เป็นผงสีขาว ซึ่งได้มาจากสารสกัดหยาบเอธิลอะซิเตดจากส่วนน้ำเลี้ยงปริมาณ 4.41 กรัม และได้จากลำดับส่วนที่ BE 018 น้ำหนัก 900 มิลลิกรัม ของสารสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากน้ำเลี้ยงรา ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ 2-4 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธนเป็นตัวชะ กรองแยกผงสีขาวออกมาโดยล้างด้วยไดคลอโรมีเธน-เมธานอล ได้ผงสีขาวหนัก 149 มิลลิกรัม (0.677 % w/v) และได้จากส่วนสกัดเอธิลอะซิเตตจากน้ำเลี้ยงรวม 4.559 กรัม (20.72 % w/v) ละลายได้ในไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และ EtOH : H_2O ในอัตราส่วน 50:50

3.12.1.4 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของลำดับส่วนที่ 1121-1174 (BE 023)

สารประกอบ 4 เป็นผลึกสีขาว ซึ่งได้มาจากสารสกัดหยาบเอธิลอะซิเตดจากลำดับส่วนที่ BE 023 น้ำหนัก 127.2 มิลลิกรัม ของสารสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากน้ำเลี้ยงราที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ 6-10 % เมธานอลในไดคลอโรมีเธนเป็นตัวชะ ล้างน้ำมันสีส้มออกด้วยเมธานอลแล้วกรองแยกผลึกออกมา ได้ผลึกสีขาวหนัก 31.9 มิลลิกรัม (0.145 % w/v) ละลายได้ในไดเมธิลซัลฟอกไซด์

3.12.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากเส้นใย

นำส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากเส้นใย น้ำหนัก 700 มิลลิกรัม มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (81.40 กรัม) คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 เซนติเมตร สูง 50.0 เซนติเมตร ตัวชะที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน-ไดคลอโรมีเธน, ไดคลอโรมีเธน, ไดคลอโรมีเธน-เมธานอล และเมธานอล ตามลำดับ



แผนภาพที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการแยกสารจากส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากเส้นใยราเอนโดไฟต์ 50MLY-5 ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี

3.12.2.1 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของลำดับส่วนที่ 41-50 (ME 04)

สารประกอบ **5** เป็นของแข็งสีขาว ซึ่งได้มาจากลำดับส่วนที่ ME04 น้ำหนัก 31.90 มิลลิกรัม ของสารสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากเส้นใย ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 40 % เฮกเซนในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ ได้น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว แล้วนำล้างส่วนน้ำมันออกด้วยเฮกเซนจะได้ของแข็งสีขาวหนัก 21.43 มิลลิกรัม (0.097 % w/v) ซึ่งสามารถละลายได้ในคลอโรฟอร์ม

3.13 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารประกอบที่แยกได้

วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารประกอบด้วยวิธี The Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC) (Jorgensen, J.H., 1999) เป็นการหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้โดยใช้ Microtiter Plate Broth Dilution Technique มีขั้นตอนการทดสอบ ดังนี้

ก. <u>การเตรียมสารละลายสารประกอบ</u>

นำสารประกอบ 1.0 มิลลิกรัม ผสมกับตัวทำละลาย 10 % DMSO ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสารประกอบที่ความเข้มข้น 250 µg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นแรกในระดับความเข้มข้นที่เราต้องการ หลังจากนั้นก็เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ระดับความเข้มข้น 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 และ 3.91 µg/ml ตามลำดับ

ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบ คือ

ความเข้มข้นสุดท้าย 125 µg/ml

ความเข้มข้นสุดท้าย 62.5 µg/ml

ความเข้มข้นสุดท้าย 31.25 µg/ml

ความเข้มข้นสุดท้าย 15.63 µg/ml

ความเข้มข้นสุดท้าย 7.82 µg/ml

ความเข้มข้นสุดท้าย 3.91 µg/ml

ความเข้มข้นสุดท้าย 1.96 µg/ml

ความเข้มข้นสุดท้าย คือ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายสารประกอบที่วัดได้ใน 96 well microtiter plate หลังจากเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบลงไป

ข. <u>การเตรียมสารละลายสารชุดควบคุมบวก</u> (Positive Control)

ใช้ Penicillin G, Erythromycin, Sulfadimidine, Streptomycin, Iprodine และ Ketoconazole เป็นสารชุดควบคุมบวก ในการเจือจางสารละลายทำเช่นเดียวกับการเจือจางสารละลายสารประกอบในข้อ 3.13 ก.

ค. <u>การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์</u>

จุลินทรีย์สำหรับทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อรา 1 ชนิดได้แก่ *Candida*

albicans ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.2 (ภาคผนวก ก) การเตรียมเชื้อทดสอบจะเตรียมตามข้อ 3.8.1.3 และ 3.8.1.4 โดยแบคทีเรียจะนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) และราจะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast-Malt Extract Broth (YMB) โดยที่ความเข้มข้นของเชื้อทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 3.3 (ภาคผนวก ก)

ง. <u>การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์</u>

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์จะทำการทดสอบใน 96 well microtiter plate โดยก่อนการหยอดสารละลายสารประกอบและสารชุดควบคุมบวก ให้ทำแผนผังระบุชนิดและตำแหน่งของสารที่จะหยอดลงใน 96 well microtiter plate เสียก่อนเพื่อความถูกต้องของการแปลผลการทดสอบที่ได้สารที่จะหยอดลงใน 96 well microtiter plate มีดังนี้

<u>Blank</u> - อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว
- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบ
- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและสารละลายสารประกอบตามระดับความเข้มข้น

<u>Positive Control</u> - อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบ + ระดับความเข้มข้นของยา

<u>ตัวอย่างทดสอบ</u> - อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบ + ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบ

ปริมาตรที่ใช้ คือ สารจุลินทรีย์แขวนลอย 50 µl และ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว+ สารละลายสารประกอบ 50 µl ซึ่งจะรวมได้ปริมาตรที่ใช้ 100 µl / หลุม

จ. <u>การแปรผล</u>

อ่านผลการทดลองเป็นค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Sunrise Microtiter Plate Reader ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบของเชื้อก่อนบ่มเชื้อกับค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและสารละลายสารประกอบตามระดับความเข้มข้นโดยให้เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของเลี้ยงเชื้อเหลวและจุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบ + ลำดับความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบหลังจากบ่มเชื้อแล้ว 24 ชั่วโมง

หากค่าการดูดกลืนแสง ของตัวอย่างทดสอบหรือ Positive Control มีค่าสูงกว่า แสดงว่าสารละลายสารประกอบหรือยาในความเข้มข้นนั้นๆ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

แต่ถ้าค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบหรือ Positive Control มีค่าต่ำกว่า แสดงว่าสารละลายสารประกอบหรือยาในความเข้มข้นนั้นๆ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

ความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบตัวสุดท้ายที่มีค่าต่ำกว่า ค่านั้นคือค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentration)

หมายเหตุ อาจมีการเพิ่มระดับความเข้มข้น หรือลดระดับความของสารละลายสารประกอบเพื่อหาค่า MIC