บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 แหล่งของพืชที่ใช้ในการทดลอง

ใบดาวเรือง (*Tagetes erecta* L.) มีระยะเวลาการปลูก 45 วัน เก็บจากแปลงเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

3.2 สภาวะที่ใช้ในการทดลอง

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นำมาใช้ในการสกัดและการทำโครมาโทกราฟีได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตต และเมทานอล จะถูกนำมากลั่นที่อุณหภูมิจุดเดือดของตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

การจัดกลุ่มสารสำคัญและการแยกสารให้บริสุทธิ์ทำโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีคือ คอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลของ Scharlau GE0048 ขนาด 0.02-0.06 มิลลิเมตร และคลุกสารสกัดหยาบหรือสารที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ก่อนการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยซิลิกาเจลของ CARLO ERBA ขนาด 0.06-0.2 มิลลิเมตร สำหรับ ส่วนทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) ใช้ซิลิกาเจล 60 F_{254} บนแผ่นอะลูมิเนียม จุดของสารสำคัญพิสูจน์ด้วยการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร) และใช้รีเอเจนต์ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับสารสำคัญได้แก่ anisaldehyde-H_2SO_4 reagent ป้ายบนแผ่น TLC แล้วนำไปให้ความร้อนบนแผ่นนำความร้อน (hot plate) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

สเปกตรัม ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR ถูกบันทึกด้วยเครื่องฟูเรียทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300 ที่ความถี่ 300 เมกะเฮิร์ท การเตรียมตัวอย่างทำโดยละลายสารตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย $CDCl_3$ สเปกตรัม ^{1}H NMR จะปรากฏตำแหน่งสัญญาณโปรตอนของ $CDCl_3$ ที่ δ 7.27 ppm สำหรับสเปกตรัม ^{13}C NMR ปรากฏตำแหน่งสัญญาณของคาร์บอน ที่ δ 77.0 ppm ตามลำดับ

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. เก็บตัวอย่างใบดาวเรืองที่เจริญเติบโตสมบูรณ์ ไม่มีโรคและแมลงรบกวน ล้างด้วยน้ำ ผึ่งลม แล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนแห้ง และนำมาบดให้ละเอียด

2. เตรียมสารสกัดหยาบเมทานอล โดยการแช่ใบดาวเรือง เป็นเวลา 7 วัน จำนวน 3 ครั้ง กรองแยกกาก และนำของเหลวผลกรองไประเหยเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจะได้สารสกัดหยาบเมทานอล

3. จัดกลุ่มสารสำคัญโดยนำสารสกัดหยาบเมทานอลมาสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน (Solvent Partitioning Extraction) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตต และบิวทานอล ตามลำดับ และทำการระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่องระเหย

สุญญากาศ ได้สารสกัดหยาบของตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิดได้แก่ สารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต และสารสกัดหยาบบิวทานอล ตามลำดับ

4. นำสารสกัดหยาบในแต่ละชั้นมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี Disc diffusion method

5. วิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC; Minimum inhibitory concentration)

6. วิเคราะห์กลุ่มสารที่พบในสารสกัดด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี

7. จัดกลุ่มสารและแยกสารออกฤทธิ์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟี

3.4 การเตรียมสารสกัดหยาบเมทานอล

1. นำใบดาวเรืองแห้งที่บดละเอียด 1.20 กิโลกรัม แช่ด้วยเมทานอล ปริมาตร 4 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ทำการคนของผสม จากนั้นนำมาอุ่นในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส วันละ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

2. กรองสารสกัดผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ได้ของเหลวผลกรองชั้นเมทานอล จากนั้นระเหยเมทานอลด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ ส่วนกากนำมาแช่ด้วยเมทานอลเช่นเดียวกับข้อ 1

3. นำสารสกัดหยาบเมทานอลมาทำการสกัดแบบแบ่งส่วน ดังแผนภาพที่ 3.1

3.5 การแยกสารสกัดหยาบโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี

เมื่อวิเคราะห์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในแต่ละชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ จะนำสารสกัดหยาบในชั้นที่ให้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ดีที่สุดมาแยกออกเป็นสารส่วนย่อย โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้เทคนิคทั้งสองควบคู่กัน มีวิธีดำเนินการดังนี้

1. แบ่งสารสกัดหยาบมาหาระบบตัวทำละลายในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยเทคนิค TLC (Thin Layer Chromatography) พบว่าการแยกของสารชัดเจนที่สุด และเก็บสารสกัดหยาบชั้นนี้ไว้สำหรับเทียบ TLC ของสารส่วนย่อยในการแยกโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

2. ทำการตัดแผ่น TLC ขนาด 2 x 5 เซนติเมตร จากนั้นทำการขีดเส้นจากปลายขอบบนและขอบล่างของแผ่น TLC (เพื่อกำหนดระยะทางที่ตัวทำละลายพาสารที่ต้องการแยกเคลื่อนที่ไป) จากนั้นทำการจุดสารที่ได้จากสารสกัดหยาบที่แยกได้หลังทำการระเหยตัวทำละลายออก แล้วแบ่งออกมาใส่ในขวดเก็บสาร และทำการจุดสารลงบนแผ่น TLC

3. เตรียม TLC แท็งค์ โดยทำให้ในแท็งค์อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายในอัตราส่วนต่างๆ ที่เตรียมไว้ โดยใช้กระดาษกรองวางไว้ด้านในแท็งค์ และปิดด้วยกระจก

4. ทำการทดสอบอัตราส่วนของสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเริ่มจากสารละลายที่มีขั้วต่างกันในอัตราส่วน 1:90 จากนั้นวางแผ่น TLC ลงใน TLC แท็งค์ ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งตัวทำละลายเคลื่อนที่มาถึงเส้นด้านบนที่ขีดไว้ ถ้าสารแยกออกจากกันได้ดีจะพบการแยกของสารเกิดขึ้นเป็นจุดที่ชัดเจน ถ้าไม่พบเป็นจุดชัดเจนให้ทำการเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของตัวทำละลายในอัตราส่วนที่

เหมาะสม เพื่อหาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการแยกสาร พิจารณาได้จากค่า R_f (Retardation factor) ไม่ควรมากกว่า 0.3

5. นำแผ่น TLC มาทดสอบการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร จากนั้นทำการวงจุดที่เห็นเป็นสารเรืองแสง

6. ป้ายรีเอเจนต์ที่ทำให้เกิดสีเฉพาะตัวของสาร (anisaldehyde-H_2SO_4 reagent) ให้ทั่วทั้งแผ่น TLC แล้วนำไปวางบนแผ่นให้ความร้อน (Hot plate) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของสีในบริเวณที่ได้วงไว้ ทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลง

7. เมื่อได้อัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสม นำมาใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography)

3.6 การเตรียมคอลัมน์และการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

1. เตรียมคอลัมน์แบบ Slurry โดยใช้ซิลิกาเจล ขนาด 0.02-0.06 มิลลิเมตร ทำให้เป็นของเหลวข้นในตัวทำละลาย

2. ใช้สำลีที่ชุ่มด้วยตัวทำละลายอุดที่ปลายคอลัมน์ เทซิลิกาเจลที่เตรียมไว้ลงในคอลัมน์

3. ทำการปรับผิวหน้าของซิลิกาเจลให้เรียบและแน่น ทำการป้องกันพื้นผิวด้านบนของซิลิกาเจลด้วยทราย

4. ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบ ละลายด้วยตัวทำละลายลงไปเล็กน้อย จากนั้นใส่ซิลิกาเจลขนาด 0.06-0.20 มิลลิเมตร คลุกให้เข้ากัน ทำการระเหยตัวทำละลายออกให้หมดและเทใส่ลงในคอลัมน์

5. ใช้ตัวทำละลายชะคอลัมน์จากนั้นทำการเพิ่มขั้วของตัวทำละลายทีละน้อยอย่างต่อเนื่อง เพื่อแยกสารที่ต้องการออกจากคอลัมน์

6. เก็บสารที่ออกจากคอลัมน์ ตรวจสอบสารด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี พร้อมทำการตรวจสอบการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร แล้วทดสอบด้วย anisaldehyde reagent

7. จัดกลุ่มสารโดยรวมสารส่วนย่อยให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยพิจารณาจากแผ่น TLC ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

3.7 การแยกสารส่วนย่อยจากชั้นสารสกัดหยาบด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

1. เตรียมคอลัมน์ตามวิธีในหัวข้อ 3.6

2. นำสารสกัดหยาบที่ผสมกับซิลกาเจลลงในคอลัมน์โดยไม่ต้องทำการกลั้วขวดก้นกลม ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ประมาณ 700 มิลลิลิตร เป็นตัวชะ จากนั้นทำการเพิ่มขั้วตัวทำละลายอย่างต่อเนื่องด้วยเอทิล แอซิเตต เพื่อแยกสารที่ต้องการออกจากคอลัมน์

3. เริ่มเก็บสารที่ถูกชะอยู่ห่างจากปลายคอลัมน์ประมาณ 5 เซนติเมตร โดยเก็บสารที่ออกจากคอลัมน์ด้วยขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร เก็บประมาณ 20 มิลลิลิตร (หรือหลอดทดลอง) และทำการตรวจสอบสารในแต่ละขวดด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography) ทำการเพิ่มขั้วของตัวทำละลายและทำการตรวจสอบด้วยการส่องแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร แล้วทดสอบด้วย anisaldehyde reagent

4. เมื่อสารที่ต้องการแยกออกมาให้ทำการจดบันทึกว่า เริ่มออกจากขวดที่เท่าใดและจำนวนเท่าใด รวมสารที่แยกด้วยแผ่น TLC ถ้าสารออกมาเหมือนกันให้ทำการรวมสารละลายที่แยกออกมาได้เข้าด้วยกันแล้วทดสอบ TLC อีกครั้งจึงระเหยตัวทำละลายออก

5. การแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

3.8 การหาองค์ประกอบทางเคมีของใบดาวเรือง

การหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบดาวเรืองนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมส สเปกโทเมตรี (GC : Agilent Technologies Model 6890N, MS:Agilent Techologies Model 7683) ใช้คอลัมน์ DB-Wax วิเคราะห์ด้วยการคำนวณร้อยละขององค์ประกอบด้วยพื้นที่ใต้พีค FID (Flame Ionization Detector Peak) สภาวะที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สภาวะของ GC-MS ที่ใช้ในการทดลอง

Instrumentation	
Chromatographic system:	Agilent 6890 GC
Inlet	Spilt
Detector	Agilent 5973 MSD
Linear	Split inner (p/n 5183-4647)
Column	30 x 0.25 mm ID, 0.25 μm HP-5 (J&w 122-7032)
Experimental Conditions GC-MS	
Inlet temperature	250°C
Injection volumn	1 μL
Split ratio	100/1
Carrier gases	Helium, flow rate 1 mL/min
Oven temperature	3 min, 4°C/min, 165°C 5 min, 10 min/min, 290°C 10 min
Detection temperature	290°C
Detector gas	Helium

3.9 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method

การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบ สารส่วนย่อย และสารบริสุทธิ์ที่แยกจากใบดาวเรือง จะทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method ณ หน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสาขาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Bauer และคณะ [21] ซึ่งวิธีการทดสอบทั้งสองจะคล้ายคลึงกันสรุปได้ดังนี้

1. นำเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เก็บไว้บน Tryticase Soy Agar (TSA) เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Meuller Hinton Agar (MHA) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อราใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud Dextrose Agar (SDA) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2. หลังจากนั้นทำการเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกกระตุ้นแล้วลงมาใน 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ ปรับให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 Mcfarland

3. นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมได้มาเพาะลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Ager อยู่ โดยการขีดลงบนหน้าวุ้นให้ทั่วจำนวน 3 ครั้ง ทำให้ได้จานอาหารเลี้ยงเชื้อมีชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ อยู่บนหน้าวุ้น

4. หลังจากนั้นนำแผ่นดิสก์ขนาด 0.6 มิลลิเมตร ที่มีสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งละลายด้วย DCM วางบนผิววุ้นที่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จากนั้นทำการบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 3.2)

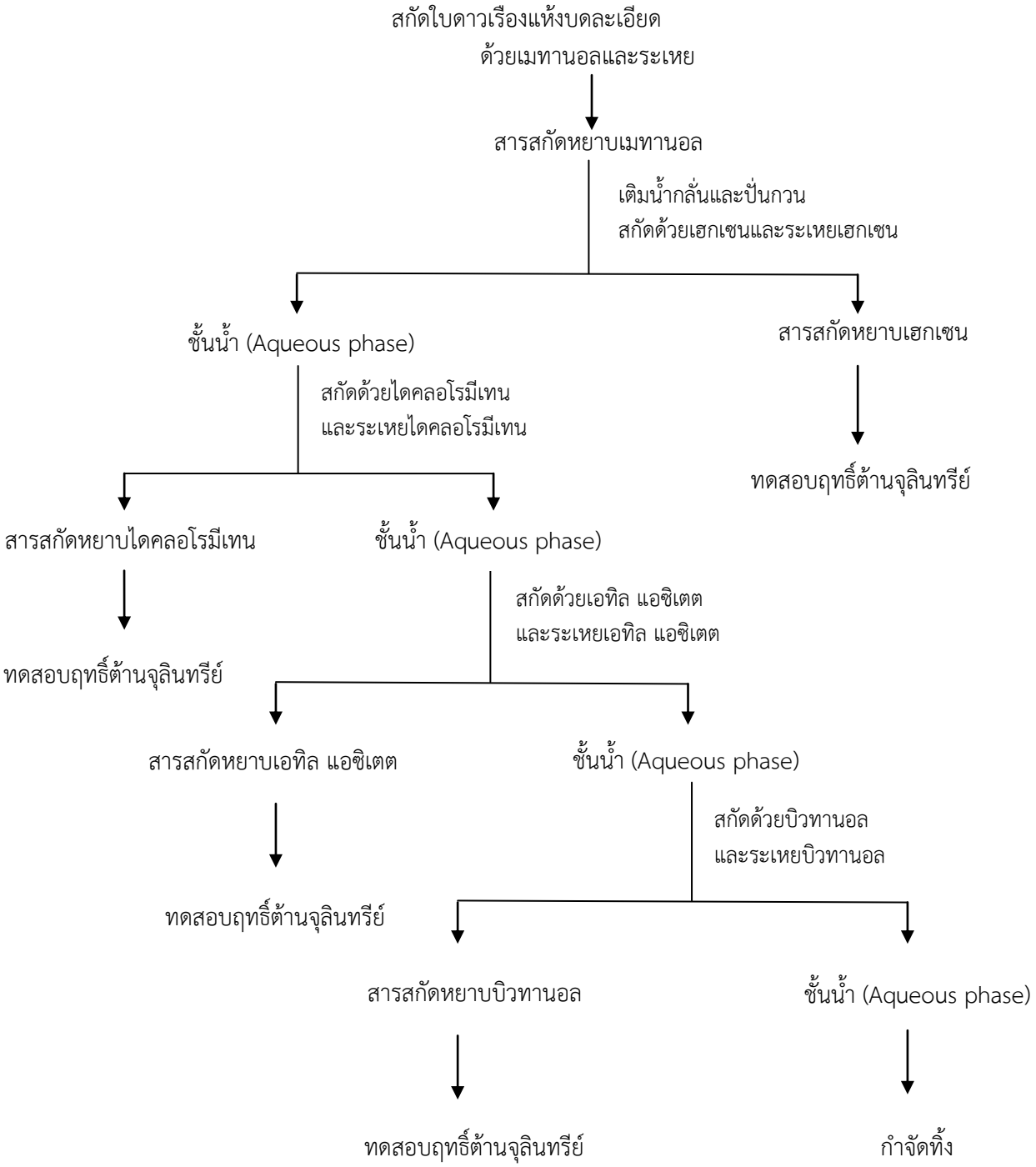
5. อาหารสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ใช้เป็นชนิด Sabouraud Agar และทำการบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งอุณหภูมิและเวลาขึ้นอยู่กับเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด

6. ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone ที่เกิดขึ้น (ภาพที่ 3.3)

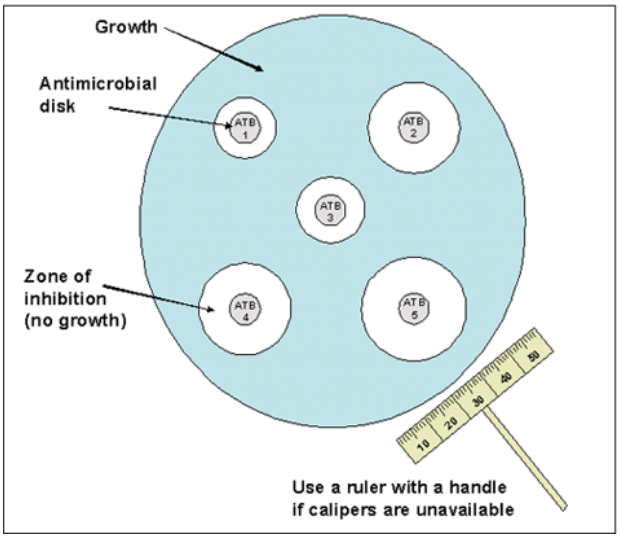
ทดสอบการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเตต และบิวทานอล จะทำการทดสอบ ณ หน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ส่วนยีสต์ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยใช้ความเข้มข้นของสารตัวอย่างเท่ากับ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (1 ไมโครกรัม/disc) กรณีทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียใช้ Penicillin Ampicillin Gentamicin Caftazidime และ Clavulanic acid เป็นตัวยาเปรียบเทียบ และกรณีทดสอบกับเชื้อราใช้ Nystatin เป็นตัวยาเปรียบเทียบ ในแต่ละชุดการทดลองจะใช้ DMSO เป็นชุดควบคุม

และทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตต และบิวทานอล สารส่วนย่อย และสารบริสุทธิ์ จะทำการทดสอบ ณ สาขาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ 18 ชนิด แบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิดได้แก่ Bordetella *pertussis* และ *Vibrio cholera* แบคทีเรียแกรมบวก 16 ชนิดได้แก่ *Streptococcus milleri* group, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus pneumonia*, *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20626, *S. aureus* (MRSA) 20627, *S. aureus* (MRSA) 20630, *S. aureus* (MRSA) 20631, *S. aureus* (MRSA) 20633, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (MRSA) 20644, *S. aureus* (MRSA) 20645, *S. aureus* (MRSA) 20652, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 ส่วนยีสต์ 3 ชนิดได้แก่ *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*. ตัวยาเปรียบเทียบได้แก่ Penicillin Amoxicillin และ Vancomycin เป็นตัวยาเปรียบเทียบ ในแต่ละชุดการทดลองจะใช้ DMSO เป็นชุดควบคุม

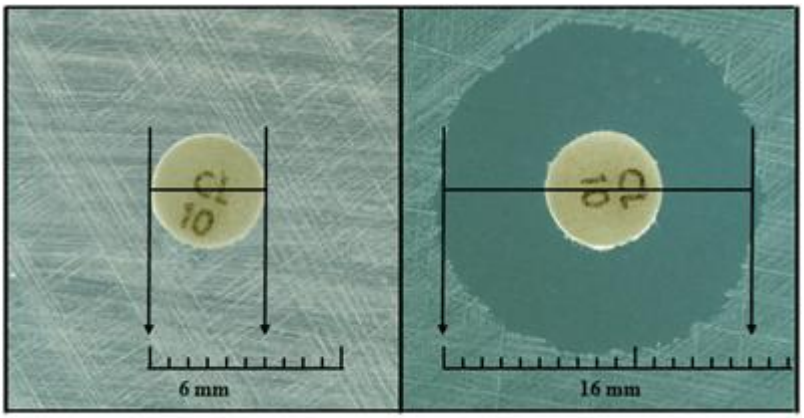
การอ่านผลการทดลองพิจารณาดังนี้: ถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 2 มิลลิเมตร แต่น้อยกว่า 5 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับอ่อน (weak) ถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร แต่น้อยกว่า 8 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับปานกลาง (moderate) และถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 8 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับดี (good)



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดด้วยวิธี Solvent Partitioning Extraction



ภาพที่ 3.2 ตัวอย่างของบริเวณของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Zone of inhibition)



ภาพที่ 3.3 วิธีการวัด Zone of inhibition