

## บทที่ 3

### วิธีวิจัย

#### อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

##### วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. Trypticase soy broth
2. Todd Hewitt broth (THB)
3. Trypticase soy agar
4. Brucella Blood Agar (BRUTryptone)
5. NaCl
6. Glucose
7. Glutamic acid
8.  $K_2HPO_4$
9.  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
10. KCl
11. Sorbose
12. D-galactose
13. Sucrose
14. Corn oil
15. Monosodium glutamate
16.  $NH_4H_2PO_4$
17.  $(NH_4)_2SO_4$
18.  $(NH_4)NO_3$
19.  $KNO_3$
20.  $(NH_4)_2HPO_4$
21. Parafilm
22. DMSO
23. SLS
24. Chloroform
25. isoamyl alcohol

26. sodium acetate
27.  $\text{MgCl}_2$
28. ethanol
29. 2 MTFA ( Trifluoroacetic acid, 99% Sigma-Aldrich)
30. Methanol (Chromasolv for high performance liquid chromatography, vwr)
31. Nitrogen
32. Distilled water
33. Acetonitrile (99.5+%A.C.S. reagent, Sigma-Aldrich)
34. Thymol reagent: 0.5 g Thymol (99.5% Sigma-Aldrich), 5 ml sulfuric acid (95-98% A.C.S. reagent, Sigma-Aldrich), 95% Ethanol 96%)
35. Anisaldehyde-Sulfuric acid reagent:
36. p-anisaldehyde (98%, Sigma-Aldrich)
37. sulfuric acid (95-98% A.C.S. reagent, Sigma-Aldrich)
38. Glacial acetic acid (100%, Riedel-de Haen)
39. Ethanol Prima 96%
40. Zein
41. Squalene
42. Tween
43. Mineral oil
44. Glycerin
45. Propylene glycol
46. Olive oil
47. Sunflower oil
48. Soy bean oil
49. Xylene
50. Kerosene
51. Gentamicin
52. BHT
53. Quercetin
54. Kaempferol
55. DPPH
56. AAPH



57. Thiobarbituric acid
58. triton X-100

### วัสดุอุปกรณ์

1. ถังหมักแบบไม่ต่อเนื่องขนาด 5 ลิตร
2. เครื่อง freeze dryer
3. 384 well microplate
4. microcentrifuge tube
5. เครื่อง centrifuge
6. เครื่อง vortex
7. QIAquick column
8. heat box
9. เครื่องวัด surface tension ( Tensiometer )
10. V-Vials, 3.0 ml Graduated (Wheaton, Millville, USA)
11. Oven (Heraeus instruments Type:UT6060)
12. DC-plates (DC-Alufolien 10x20 cm Kieselgel 60 F254, Merck)
13. TLC chambers (width:6 cm, height:20 cm)
14. Oven (heraeus instruments Type:UT6060)
15. Hairdryer, Linomat 4 LAMAG
16. เครื่อง LC-MS

### เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย คือ *Pseudomonas aeruginosa* SMU106 ที่แยกได้จากดินปนเปื้อนน้ำมันบริเวณช่ออมรด จังหวัดเชียงใหม่ โดยใช้วิธีคัดแยกเบื้องต้นจากความสามารถโดยวิธีการกระจายตัวบนพื้นผิวของน้ำมัน (oil displacement test) และได้ผ่านการ isolated และ identified เชื้อเรียบร้อยแล้วจากงานวิจัยที่ได้ทำในปีที่ 1 ( รายงานวิจัยประจำปี พ.ศ. 2550)
2. *β-hemolysis streptococcus* group A,
3. *Staphylococcus aureus* ATTC 29213,
4. MRSA
5. *Escherichia coli* ATCC 25922

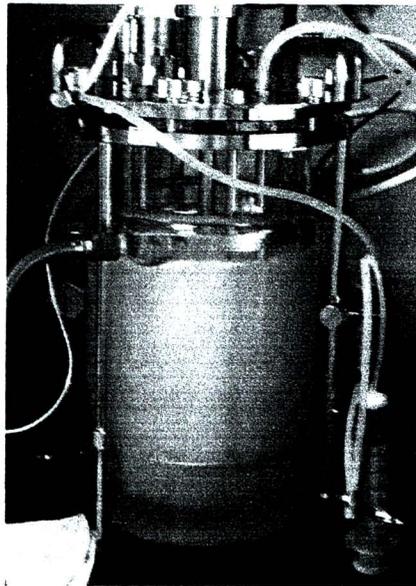


## วิธีดำเนินงานวิจัย

### ตอนที่ 1: การผลิต สกัดแยกสารบริสุทธิ์ และศึกษาโครงสร้างเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

#### 1.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมัก

ใช้วิธีการผลิตที่ได้ผ่านการศึกษาค้นคว้าที่เหมาะสม ( optimization ) ในถังหมัก ( Fermentor ) เพื่อการผลิตให้ได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีทั้งปริมาณและคุณภาพที่ดีที่สุด จากงานวิจัยที่ได้ทำในปีที่ 2 ( รายงานวิจัยประจำปี พ.ศ. 2551 ) ดังนี้ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* SMU106 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมคือ glucose (3g/L), 1% corn oil,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (0.3g/L), pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยมีการกวนด้วยใบพัดในอัตราเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปั่นเซลล์ด้วยเครื่อง centrifugation ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer ได้เป็นผงแห้งสีเหลือง จะเรียกว่า ผงแห้งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ( Freeze dried powder crude biosurfactant, FCBS )

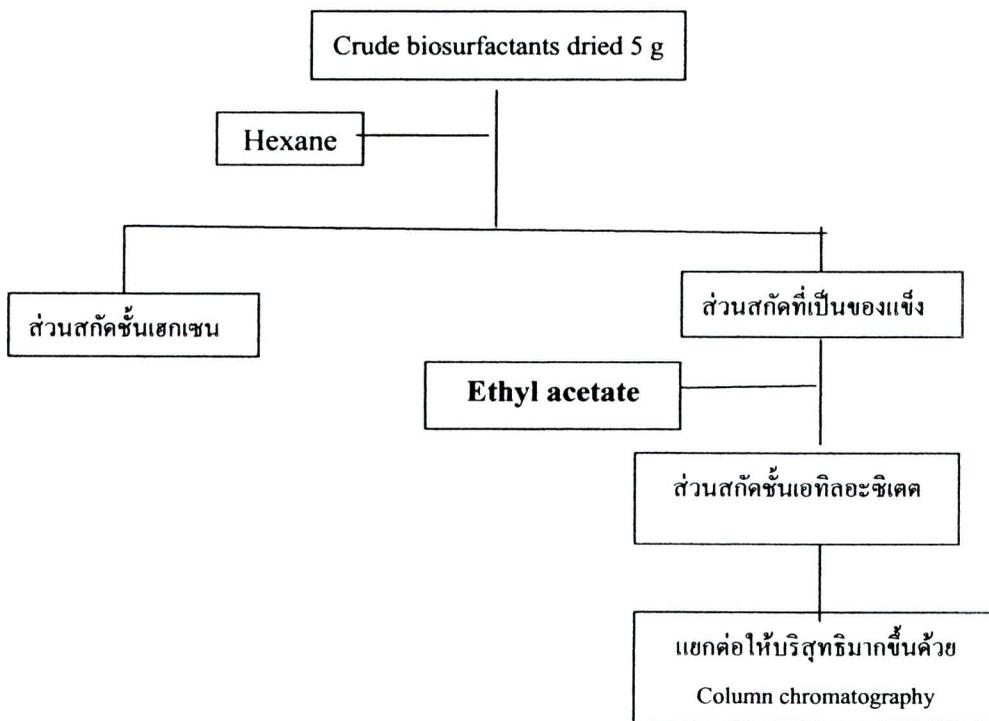


รูปที่ 3.1: การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในถังหมักขนาด 5 ลิตร

#### 1.2: การแยกสกัดและทดสอบเอกลักษณ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

##### 1.2.1 การแยกสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพวิธีที่ 1

นำผงแห้งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมา 5 กรัม สกัดแบบแบ่งส่วนการละลาย (Solvent partition extraction) ด้วยสารละลายเฮกเซน ในอัตราส่วน 1 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้นระหว่างของเหลวกับของแข็ง (สกัดจำนวน 3 ครั้ง) นำของแข็งดังกล่าวสกัดซ้ำด้วยเอทิลอะซิเตต ในอัตราส่วนเดียวกับสารละลายเฮกเซน ตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้น (สกัดจำนวน 3 ครั้ง) รวมชั้นสารของสารสกัดเอทิลอะซิเตตเข้าด้วยกัน นำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดัน โดยใช้เครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนเข้มข้น ได้สารสกัดแยกส่วนเอทิลอะซิเตต ดังแสดงขั้นตอนการสกัดในรูปที่ 3.2 จากนั้นนำไปแยกต่อให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วย Column chromatography



รูปที่ 3.2: ขั้นตอนการแยกสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* SMU106 วิธีที่ 1

การแยกบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column chromatography) วิธีที่ 1 และศึกษาโครงสร้างทางเคมี

-การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมด้วยแผ่น TLC

นำสารตัวอย่างที่ต้องการแยกและทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น มาตรวจสอบและหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารต่างๆ ออกจากระบบด้วย TLC plate โดยใช้ Orcinol เป็น spray reagent

### -การทำคอลัมน์ โครมาโตกราฟี (Column chromatography)

นำสารสกัดแยกส่วนเอทิลอะซิเตต ที่ระเหยแห้งจากข้อ 1.2.1 มาทำการแยกต่อให้บริสุทธิ์มากขึ้น ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้สารสกัดเท่ากับ 0.6925 กรัม บรรจุลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 เซนติเมตร ซึ่งได้แพคคอลัมน์แบบเปียกด้วย silica gel ที่มีขนาดรูพรุนของเจลเท่ากับ 0.063-0.2 มิลลิเมตร สูง 15 เซนติเมตร เก็บ fraction ในหลอดทดลองและตรวจสอบบนแผ่น TLC โดยการพ่นด้วย orcinol และนำไปให้ความร้อนที่ 80-100 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5 นาที เพื่อหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC รวม fraction ที่เกิดแถบเหมือนกันเข้าด้วยกัน แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่อง rotary evaporator สามารถเก็บได้ทั้งหมด 13 fraction และนำ fraction ที่ได้แยกเดี่ยวไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี NMR เพื่อศึกษาโครงสร้างต่อไป

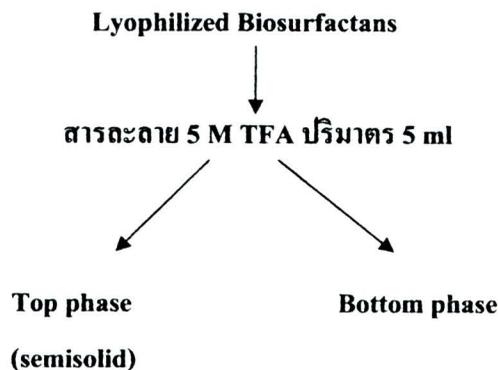
### 1.2.2 การแยกสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ วิธีที่ 2

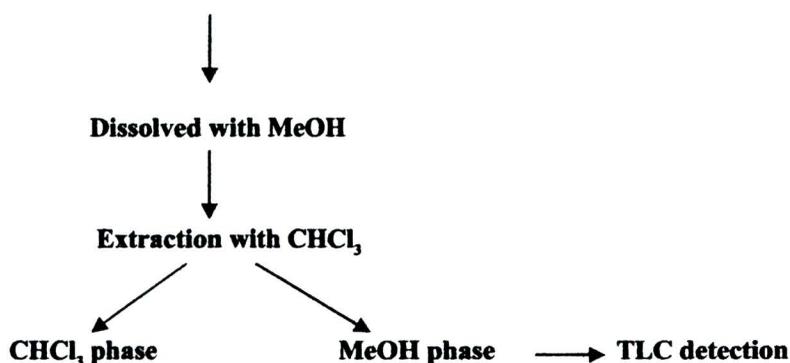
#### - การทดสอบกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

-นำผงแห้งสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจากข้อ 1.1 ในปริมาณ 0.26 กรัม ผสมกับกับสารละลาย 5 M TFA ( Trifluoroacetic acid) ปริมาตร 5 ml เขย่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 45 แยกชั้นที่เป็นของแข็งกับของเหลว เดิม absolute methanol ปริมาตร 5 ml ในส่วนที่เป็นของแข็งในหลอดทดลอง

-สกัดสารอีกครั้งด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตร 5 ml จำนวน 2 ครั้ง แล้วแยกส่วนที่เป็นชั้นของเมทานอลกับชั้นที่เป็นคลอโรฟอร์ม

-นำส่วนที่เป็นชั้น methanol ไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง evaporator ทดสอบหมู่ของสารด้วย TLC โดยใช้ developing solvent คือ acetonitrile : water = 17 : 3 และมีน้ำตาลเรมโนส ( Rhamnose) เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งสามารถสรุปได้เป็นโคอะแกรมได้ดังนี้





รูปที่ 3.3: ขั้นตอนการแยกและวิเคราะห์หากกลุ่มชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* SMU106 วิธีที่2

### -การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

#### การทำปฏิกิริยา Methanolysis

-นำสารตัวอย่างที่ต้องการแยก 250 กรัม เติม absolute methanol 5 ml เติมโซเดียมเมทอกไซด์ (sodium methoxide) 2 ml ทำปฏิกิริยาที่ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีน้ำ เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดหยุดปฏิกิริยา ทำการแยกสารระหว่างเฟสที่เป็นของแข็งและของเหลวออกจากกันโดยใช้วิธีการกรอง

- นำเฟสที่เป็นของแข็งมาล้างด้วยเมทานอล (absolute) 5 ml แยกส่วนที่เป็นน้ำกับของแข็งอีกครั้ง เติม 2M TFA (Trifluoroacetic acid) ปริมาณ 2 ml ลงในหลอดทดลอง แล้วนำไประเหยให้แห้งโดยใช้ก๊าซไนโตรเจนเป่าให้แห้ง

-นำสารตัวอย่างดังกล่าวไปสกัดด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตร 2 ml อีกสองครั้ง แยกส่วนที่เป็นของแข็งและของเหลวออกจากกัน โดยนำส่วนที่เป็นของแข็งไปทำการทดลองต่อ โดยเติม pyridine : acetic acid (1:1) 2 ml ในหลอดทดลอง นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

-เติม pyridine : acetic acid (1:1) 2 ml ในหลอดทดลองอีกครั้ง แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำลงไปหลอดทดลองประมาณ 1 ml จากนั้นนำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง evaporator

#### การตรวจสอบและหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสาร

นำสารตัวอย่างที่ต้องการแยกและทำให้บริสุทธิ์ มาตรวจสอบและหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารต่างๆ ออกจากกัน ด้วย silica gel thin layer chromatography เพื่อนำข้อมูลคุณสมบัติการละลายไปใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ต่อไป โดยวิธีการตรวจสอบสารที่แยกได้จาก silica gel thin layer chromatography จะใช้ thymol spray reagent, ไอโอดีน (iodine) และแสงยูวี (UV lamp)

### การทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography)

ใช้ Silica gel column chromatography โดยนำสารตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการ methanolysis แล้วมาทำการชั่งน้ำหนักที่แน่นอน มาทำการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้คอลัมน์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 cm แพคคอลัมน์แบบเปียกด้วย silica gel ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจลเท่ากับ 0.060-0.2 mm ชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมซึ่งได้ทดสอบระบบก่อนนำมาแยกโดยใช้คอลัมน์ข้างต้น เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ครั้งละ 20 ml ทำการตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ thymol ฟันทบนแผ่น TLC และนำไปให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียสนานประมาณ 5 นาที เพื่อหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC ซึ่งจะปรากฏเป็นแถบสีที่ต่างกัน นอกจากนี้ต้องทำการเช็คจุดของสารที่เกิดขึ้นบนแผ่น TLC ด้วยไอโอดีนและแสงยูวี เพื่อรวมสารละลายในหลอดที่ให้ผลของจุดบนแผ่น TLC ที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แต่ละกลุ่มที่รวมได้ นำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นนำสารแต่ละกลุ่มที่แยกบริสุทธิ์ได้ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NMR เพื่อศึกษาโครงสร้างต่อไป

### 1.3 การทดสอบคุณสมบัติทางเคมีเพื่อหาหน่วยน้ำตาลและองค์ประกอบในโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

#### 1.3.1 การทำ Hydrolysis

ทำการชั่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประมาณ 2-3 มิลลิกรัมในหลอดทดลองขนาดกลางที่สามารถปิดฝาได้ เติมสารละลาย TFA ความเข้มข้น 2 M 0.5-1 ml ผสมให้เข้ากันด้วย mixer นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100-110 °C นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไประเหยให้แห้งโดยใช้ก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 60 °C จนกระทั่งสารละลาย TFA ระเหยหมด เติมเมทานอลปริมาตร 1 ml แล้วนำไประเหยให้แห้งโดยใช้ก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 60 °C จนกระทั่งเมทานอลระเหยหมด (ทำสามครั้งติดต่อกัน) เติมน้ำกลั่นลงไป 1 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิเย็นเพื่อทำการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

#### 1.3.2 การทดสอบวิธีโครมาโตกราฟีด้วยเครื่องมือ Linomat 4 (LAMAG)

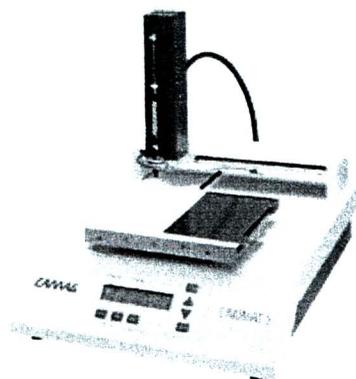
##### Standard solutions

| Standards  | Concentrations  |
|--|-----------------|
| D(+)-Glucose Monohydrate, Fluka                    | 25mg/10ml water |
| D(+)-Galactose, Sigma Ultra min. 99%, Sigma-Aldich | 25mg/10ml water |
| D(+)-Arabinose, Glycon Biochemicals                | 25mg/10ml water |

|  |   |
|--|---|
| GmbH   |   |
| D(-)-Fructose, 99+%, Sigma-Aldich              | 25mg/10ml water                             |
| L(-)-Fucose, min. 99%, Sigma-Aldich            | 25mg/10ml water                             |
| D(+)-Xlose SigmaUltra 99%, Sigma-Aldich        | 75mg/10ml water                             |
| L-Rhamnose Monohydrate, min. 99%, Sigma-Aldich | 25mg/10ml water                             |
| D-Glucuronic acid, Sigma-Aldich                | 25mg/10ml water                             |
| D(+)-Mannose SigmaUltra 99%, Sigma-Aldich      | 25mg/10ml water                             |
| D(+)-Glucose/D(+)-Xylose                       | 50 mg Glucose and 150 mg Xylose/20 ml water |
| D(+)-Galactose/D(+)-Mannose/L(-)-Fucose        | 50mg of each sugar/20 ml water              |

### วิธีทำ

- ใช้ syringe คูดสารมาตรฐานปริมาตร 30 ไมโครลิตร แล้วนำไปประกอบเข้ากับเครื่อง Linomat 4 LAMAG ( รูปที่ 3.4 ) เพื่อเตรียมสำหรับการฉีดสารลงไปในแผ่นซิลิกาเจล โดยทำการตั้งค่าโปรแกรมของเครื่องดังนี้
  - Plate width:200
  - Start position:4
  - Band:5
  - Space:5
  - Volume:2
  - Sec/  $\mu$ l:4
- ล้างหลอดฉีดด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ก่อนทำการคูดสารละลายมาตรฐานตัวอื่นแล้วทำการฉีดเหมือนกับข้อที่ 1
- ปล่อยให้สารที่ฉีดด้วยเครื่อง Linomat 4 LAMAG บนแผ่น TLC แห้งโดยการเป่าด้วย hairdryer
- นำแผ่น TLC ไปแยกสารใน developing chamber โดยมี phase เคลื่อนที่คือ acetonitrile:water (4:1)
- เมื่อแยกสารจนถึง solvent front แล้วเป่าให้แห้งด้วย hairdryer ก่อนที่จะไปทำการตรวจสอบจุดสเปคของสารด้วยการพ่น Thymol reagent or Anisaldehyde-Sulfuric acid reagent
- เป่าให้แห้งแล้วอบที่อุณหภูมิ 105-110 °C นาน 5 นาที แล้วสังเกตสีที่เกิดขึ้นของแต่ละ spot



รูปที่ 3.4: เครื่องโครมาโตกราฟีแบบอัตโนมัติ Linomat 4 LAMAG

#### 1.4 การแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์

##### 14.1. การตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกรด

ทำการแยกเซลล์ของแบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอยู่ โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 4 °C นำสารละลายส่วนใสมาทำการตกตะกอนด้วยกรดเข้มข้น HCl จนกระทั่งได้ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 3 แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนอีกครั้งที่ ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ณ อุณหภูมิ 4 °C (Deziel et al., 1999) ตะกอนที่ได้คือ ตะกอนของสารไกลโคไลปิด

##### 1.4.2. การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยสารละลาย

นำตะกอนที่ได้จากข้อ 1.4.1. มาสกัดด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (2:1) จำนวน 3 ครั้ง รวมขึ้นของสารละลายที่เป็น organic phase แล้วนำไประเหยให้แห้งด้วย evaporator จนได้เป็นของเหลวหนืด (crude extract) ซึ่งน้ำหนักที่แน่นอนแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้วิเคราะห์ต่อไป

##### 1.4.3. การทดสอบด้วย Thin layer chromatography (TLC)

ละลาย crude extract ด้วยสารละลายคลอโรฟอร์มเพียงเล็กน้อย แล้วนำไป spot บนแผ่น TLC ที่งไว้ให้แห้งแล้วนำไปใส่ ใน chamber ซึ่งมี developing solvent system คือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : กรดอะซิติก เท่ากับ 65 : 15 : 2 เมื่อสารเคลื่อนตัวถึงจุดที่กำหนด ปล่อยให้แห้งแล้วพ่นด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 15% นำไปอบที่ 110 °C นาน 5-10 นาที แล้วสังเกตสีที่เกิดขึ้น

##### 1.4.4. การแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Coulum chromatography)

ใช้ glass coulum chromatography ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 1.5 cm ยาว 30 cm ที่อบให้แห้งแล้ว ผสม silica gel 60 ที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 200–425 mesh, 0.035–0.075 mm ในคลอโรฟอร์ม คนให้เข้ากัน โดยไม่ให้มีฟองอากาศ อุดปลายคอลัมน์ด้วยสำลี แล้วเท silica gel 60 ที่ผสมแล้วลงในคอลัมน์ ละลาย crude extract biosurfactant ด้วย คลอโรฟอร์ม เล็กน้อย ทำการโหลดสารตัวอย่าง จากนั้น ค่อยๆ เติมสารละลายคลอโรฟอร์มลงไป 500 ml แล้วเปิดคอลัมน์จนกระทั่งคอลัมน์ไม่มีสีหรือใส เพื่อทำการชะ

สารกลุ่ม neutral lipid เดิมสารละลายที่ใช้เป็นตัวชะคือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : กรดอะซิติก เท่ากับ 65 : 15 : 2 (v/v/v) ปริมาตร 1,000 ml แล้วเก็บแต่ละ fraction ให้มีปริมาตรในแต่ละหลอดที่เก็บเท่ากับ 10 ml จากนั้นจึงนำแต่ละ fraction ไปทดสอบ TLC เพื่อดูการเคลื่อนที่ของสาร โดยใช้ developing solvent system เหมือนกับที่ใช้ชะในคอลัมน์ หลังจากนั้นพ่นด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 15% แล้วนำไปอบที่ 110 °C นาน 5-10 นาที แล้วสังเกตสีที่เกิดขึ้น ทำการรวม fraction ที่ให้ค่า Rf ตรงกัน แล้วนำไประเหยให้แห้งด้วย evaporator แล้วทดสอบ TLC ก่อนนำไปฉีด LC/MS และ / หรือ NMR เพื่อดูโครงสร้างต่อไป

### 1.5 การศึกษาโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 1.3 มาวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีเพื่อหาองค์ประกอบด้วย แมสสเปกโตรเมตรี (ESI-MS) โดยละลายสารตัวอย่างใน 5% acetonitrile-water ใช้ flow rate 10  $\mu$ l/min. ใช้ Nitrogen gas flows ที่ 50 และ 5. อุณหภูมิที่ใช้ในการหลอม capillary คือ 250 °C spray voltage set ตั้งที่ 5kV. และ Negative ion mode ใช้ที่ 50-2000 m/z.

### ตอนที่ 2: การศึกษาคุณสมบัติการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลองคือ น้ำกลั่น, propylene glycol, glycerin, 1% Tween 80 ในน้ำกลั่น, ethanol และ mineral oil โดยเติมตัวทำละลายดังกล่าวลงไปในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้มีความเข้มข้นดังนี้ 1:1, 1:10 และ 1:30 (w/v) จากนั้นเขย่าให้สารละลายเข้ากันด้วยเครื่องเขย่า vortex เป็นเวลา 1 นาที การทดลองดังกล่าวจะแบ่งเป็นสองกลุ่ม คือ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยสังเกตสีของสารละลาย ความหนืดของสารละลาย การจับตัวกันเป็นก้อน การตกตะกอน ซึ่งได้ศึกษาผลของระยะเวลาที่อาจจะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังนี้ วัตถุประสงค์หลังจากผสมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับตัวทำละลายและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 เดือน โดยกำหนดลักษณะสัญลักษณ์ที่ปรากฏดังนี้ O = สีเหลืองเข้ม Y = สีเหลืองอ่อน P = เกิดการตกตะกอน

### ตอนที่ 3: การศึกษาการระคายเคืองผิวหนังของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี Zein test

#### 3.1 วิธีการเตรียมสารและการทดสอบ Zein

เตรียมสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพความเข้มข้น 1% นำมา 40 mL ใส่นลงในขวดกลมรูปชมพู ปรับค่าความเป็นกรดเป็นเบสให้ได้เท่ากับ 7.0 เดิม zein ลงไป 2 กรัม ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการแยกสารละลายใสข้างบนไปทดสอบปริมาณไนโตรเจนโดยวิธีเจดดาห์ล

#### 3.2 วิธีการทำเจดดาห์ล (Kjedahl method)

-นำสารละลายใสที่ได้จากข้อ 3.1 ใส่นลงใน digestion tube ขนาด 300 mL ใส catalyst Kjeldahl 3 เม็ด ลงไปใน digestion tube เดิม conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 ml โดยใช้กรด rinse ข้างๆ digestion unit ย่อยตัวอย่างที่

อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นใน hood เมื่อตัวอย่างเย็นแล้ว นำตัวอย่างมากลั่นด้วยเครื่อง distillation unit โดยตั้งค่าปริมาตรสารที่ใช้ดังนี้

- น้ำกลั่น 80 mL

- NaOH 100 mL

- Boric acid 50 mL

- Distillation time 4.0 min.

-นำ distillate ที่ได้นี้มาไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรด HCl 0.1 N จนถึงจุดยุติ (end point)

โดยสังเกตจากสี ของ distillate ที่เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพู บันทึกปริมาณของ HCl 0.1 N ที่ใช้ ( $V_s$ )

-ทำ Blank ตามขั้นตอน ข้างต้นนี้ โดยไม่ต้องใส่สารตัวอย่างลงไป

#### การคำนวณ

จากสมการ  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3 + \text{HCl} \rightarrow \text{NH}_4\text{Cl} (\text{g}) + \text{H}_3\text{BO}_3$  จะเห็นได้ว่า  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$  1 โมล จะทำปฏิกิริยากับ HCl โมล , 1 mole  $\text{NH}_3 = 1 \text{ mole HCl}$

ถ้าใช้สารละลายมาตรฐานกรด HCl ในการไตเตรทตัวอย่าง  $V_s$  mL

$$1 \text{ mole NH}_3 = \frac{M \times (V_s - V_b)}{1,000}$$

$$\text{แสดงว่าไนโตรเจนมีอยู่ในสารละลาย} = \frac{M \times (V_s - V_b) \times 14.007}{1,000}$$

$$\text{แต่ในการทดลองซึ่งตัวอย่าง } W_s \text{ g} = \frac{M \times (V_s - V_b) \times 14.007}{1,000 \times W_s}$$

$$\text{ดังนั้นไนโตรเจน (g/100g)} = \frac{M \times (V_s - V_b) \times 14.007 \times 100}{1,000 \times W_s}$$

$$\text{Total Nitrogen (g/100g)} = \frac{M \times (V_s - V_b) \times 14.007}{W_s}$$

เมื่อ  $V_s$  คือปริมาตรสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรตกับสารตัวอย่าง (mL)

$V_b$  คือปริมาตรสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรตกับ blank (mL)

$M$  คือความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก (Normality)

14.007 คือ Molecular weight ของ Nitrogen

Protein (g/100g) =  $N(\text{g}/100\text{g})F$

Total Nitrogen รายงานในรูปแบบ g/100g สำหรับ โปรตีน รายงานในรูปแบบ g/100g

F = Protein factor ของอาหารชนิดต่างๆ

การรายงานผลการทดสอบปริมาณ zein จะรายงานผลในรูปแบบ zein number (ZN) โดยมีหลักเกณฑ์ดังนี้ (Götte, 1967)

1. For ZNs ranging from 0-200 : no skin inflammation
2. For ANs ranging from 200-400 : slight skin inflammation
3. For ranging from 400-500 : skin inflammation, slight desquamation
4. For ranging from 500-600 : strong skin inflammation, desquamation
5. For ranging from 400-500 : skin inflammation, slight desquamation
6. For ZNs above 600 : very strong skin inflammation and desquamation

**ตอนที่ 4: การศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ: คุณสมบัติการทำให้เปียก การเกิดฟอง และการชำระล้าง (detergency) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ**

#### 4.1 การทดสอบ wetting time ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Ahmed, et al., 2002)

ชั่งสำลีให้มีน้ำหนักเท่ากัน 2 ก้อน ประมาณ 30 กรัม ปั่นสำลีเป็นก้อนกลมๆ ให้แน่นและมีขนาดเท่ากันทั้งสองก้อน เตรียมสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1% (w/v) ปริมาตร 10 ml ในบีกเกอร์ขนาด 100 ml นำสำลีที่ปั่นเป็นก้อนกลมดังกล่าว หย่อนลงไป ในบีกเกอร์ ทำการจับเวลา ตั้งแต่ก้อนสำลีเริ่มสัมผัสกับสารละลายจนกระทั่งสารละลายซึมผ่านสำลีทั้งก้อน แล้วบันทึกเวลา โดยใช้สารละลาย SLS 0.1% (w/v) เป็น positive control และน้ำ เป็น negative control

#### 4.2 การทดสอบการเกิดฟองและความเสถียรของฟองของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เตรียมสารละลายลดแรงตึงผิวชีวภาพความเข้มข้น 0.1 % (w/v) เทลงในกระบอกตวงขนาด 100 ml ปิดฝาให้สนิท เขย่าด้วยมือ 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตฟองที่เกิดขึ้น วัดความสูงของฟอง และคุณลักษณะของฟอง ความละเอียด สี ความเสถียรของฟอง โดยใช้สารละลาย SLS ที่ความเข้มข้น 0.1 % (w/v) เป็นตัวเปรียบเทียบ (positive control)

#### 4.3 การทดสอบ detergency ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Surfatech, USA)

##### 4.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน SLS

เตรียมสารละลาย SLS ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.003 M

##### 4.3.2 การหา equivalent ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ซังสารตัวอย่าง (สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ) 1 กรัม ละลายในน้ำ 10 ml ทำการไตเตรตกับสารละลาย SLS ที่เตรียมไว้จากข้อ 4.3.1 จุดยุติของการไตเตรตชั้น ชั้นล่างจะเป็นสีฟ้าส่วนชั้นบนจะสีชมพูอ่อนหรือใส

คำนวณหาจำนวน equivalent ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ณ ความเข้มข้น 10 %

#### 4.3.3 การทดสอบ Squalene titer test (Turney and Cannell, 1965 and Jing-fu and Gui-bin, 2001)

-เตรียม 10 % ของสารละลาย biosurfactant, SLS และ Tween 80

-เติมน้ำกลั่น 1.5 ml ในหลอดทดลองขนาดกลาง เติม 1.5 กรัม squalene แล้วเขย่าจะทำให้สารละลาย ในหลอดทดลองแยกตัวเป็นสองชั้น

-หยดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทีละหยดแล้วทำการเขย่า

-จุดยุติของปฏิกิริยาคือ เมื่อน้ำมันจะหายไปแล้วจะเกิดอิมัลชันเกิดขึ้น บันทึกจำนวนหยด จากนั้นคำนวณหาปริมาณ squalene titer point

### ตอนที่ 5: การศึกษาคุณสมบัติการก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

#### การศึกษาก่ออิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

น้ำมันที่ใช้ในการทดลองประกอบไปด้วย Olive oil, Soy bean oil, Sun flower oil, Mineral oil, Xylene และ Kerosene สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในการทดสอบ ประกอบไปด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (BS), Sodium Lauryl sulfate (SLS) และ Tween 80 (T80) ทำการทดสอบดังนี้

-ผสมสารละลายของสารลดแรงตึงผิวนิคมต่าง ๆ (BS, SLS, T80) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1, 1.5, 2, 5 และ 10% ตามลำดับ ในหลอดทดลองขนาดกลาง โดยมีอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวดังกล่าวนี้กับน้ำมันชนิดต่างๆ เท่ากับ 5:5 (ml) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ mixer ที่ระดับความเร็วรอบสูงสุด นาน 2 นาที บันทึกผลการเกิดอิมัลชัน และตั้งทิ้งไว้ให้ครบ 24 ชั่วโมง (E24) โดยการวัดผลของอิมัลชันที่เกิดขึ้นซึ่งพิจารณาได้เช่นสมการ (1)

$$\text{Emulsification activity} = \frac{\text{ความสูงของชั้นครีม}}{\text{ความสูงทั้งหมดของสารละลาย}} \dots\dots\dots(1)$$

-หลังจากบันทึกผลการเกิดอิมัลชันเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดทดลองดังกล่าวไปอุ่นที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส แล้วทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้างต้นนี้

## ตอนที่ 6: คุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

### 6.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ทำการ Screen หาผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเปรียบเทียบกับ Gentamicin ด้วยวิธี Agar plate diffusion technique เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,  $\beta$ -Streptococci group A และ MRSA ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ใช้ในการทดสอบคือ 1% และ 5%

| ความเข้มข้น (%) | น้ำหนักสารสกัด (g) | ปริมาตรสารละลาย (ml) |
|-----------------|--------------------|----------------------|
| 1%              | 0.1                | 10                   |
| 5%              | 0.5                | 10                   |

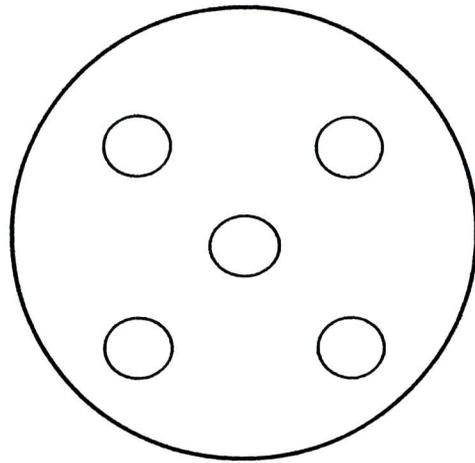
ชั่งน้ำหนักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบแล้วทำการเติมตัวทำละลายลงไป 10 ml. ทำการกรองด้วยกระดาษกรอง No.1

### การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

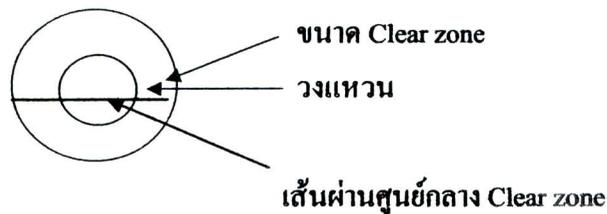
ทำการเตรียมเชื้อให้ได้ความเข้มข้น  $10^6$  CFU/ml โดยขูดเชื้อแบคทีเรียมา suspend ในอาหาร Trypticase soy broth (TSB) แล้วเทียบความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland No.5 (มีเชื้อประมาณ  $10^8$  CFU/ml)

### วิธีการทดสอบ Agar cup

ผสมเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้แล้ว 1 ml กับอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 ml Trypticase soy agar ที่ หลอมเหลวแล้วและอุ่นไว้ที่  $50^{\circ}\text{C}$  เทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อรอให้อาหารแข็งตัว เอาจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ ปล่อยให้เย็นลงจนอุณหภูมิประมาณ  $45^{\circ}\text{C}$  วางบนผิวหน้าอาหารให้ระยะห่างกันพอดี 4-5 วงแหวนต่อจานอาหาร(ดังภาพ ก.) จากนั้นจึงเททับด้วยอาหารที่ผสมเชื้อลงไปอีกชั้นหนึ่ง (10 ml) รอให้อาหารแข็งตัวแล้ว ตีวงแหวนออกจะเป็นหลุมสำหรับใส่สารตัวอย่างที่จะทดสอบ ลงไปในแต่ละหลุม ๆ ละ 200  $\mu\text{L}$  และหยอดยา Gentamicin เพื่อเป็นตัวควบคุม แล้วนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ  $35^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นหน่วยเป็นมิลลิเมตร (ดังภาพ ข.) สำหรับเชื้อ  $\beta$ -Streptococci group A จะผสมเกลือลงไปในการเลี้ยงเชื้อ 5%



รูปที่ 3.5: ก. แสดงตำแหน่งการวางวงแหวนอูมิเนี่ยมบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 3.5: ข. แสดงการวัดขนาด Clear zone

## 6.2 การทดสอบการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration : MIC)

จากการศึกษาฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าสารมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ 4 สายพันธุ์ ยกเว้นเชื้อ *E. coli* จึงนำสารสกัดทั้งสองส่วนมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ โดยวิธี **Broth macro dilution technique**

### 6.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

เชื้อโคโลนิของเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เพาะเลี้ยงไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง มาประมาณ 4-5 โคโลนิ นำมาใส่ในอาหารเหลวเขย่าเพื่อให้เชื้อกระจายตัวออกจากกัน นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3-4 ชั่วโมง โดยเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปเทียบความขุ่นโดยเทียบกับ McFarland standard No.0.5 (มีเชื้อประมาณ  $10^8$  CFU/ml)

## 6.2.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

### อาหารเหลว ได้แก่

Trypticase soy broth (TSB) ชั่ง TSB ตามจำนวนที่ต้องการใช้แล้วเติมน้ำกลั่น เขย่าให้ TSB ละลายจนหมดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อใช้สำหรับทดสอบเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ MRSA

Todd Hewitt broth (THB) ชั่ง THB ตามจำนวนที่ต้องการใช้แล้วเติมน้ำกลั่น เขย่าให้ THB ละลายจนหมดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อใช้สำหรับทดสอบเชื้อ *Streptococcus β group A*

### อาหารแข็ง ได้แก่

Trypticase soy agar (TSA) ชั่ง TSA ตามจำนวนที่ต้องการใช้แล้วเติมน้ำกลั่น ตุ่นและเขย่าให้ TSA ละลายจนหมดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ รอให้เย็นแล้วนำไปไว้ใน water bath อุณหภูมิ 50°C แล้วเทลงไปในงานเพาะเชื้อทิ้งไว้ให้แข็งเพื่อใช้ในการ streak plate สำหรับทดสอบเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ MRSA

Brucella Blood Agar (BRU) สำหรับทดสอบเชื้อ *Streptococcus β group A*

**6.2.3 การเตรียมสารตัวอย่าง:** ละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในน้ำกลั่น (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) อัตราส่วน 1:1 (สารสกัด 1 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร) ส่วน Gentamicin ทำการเจือจางในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้มีความเข้มข้น 75 µg/ml

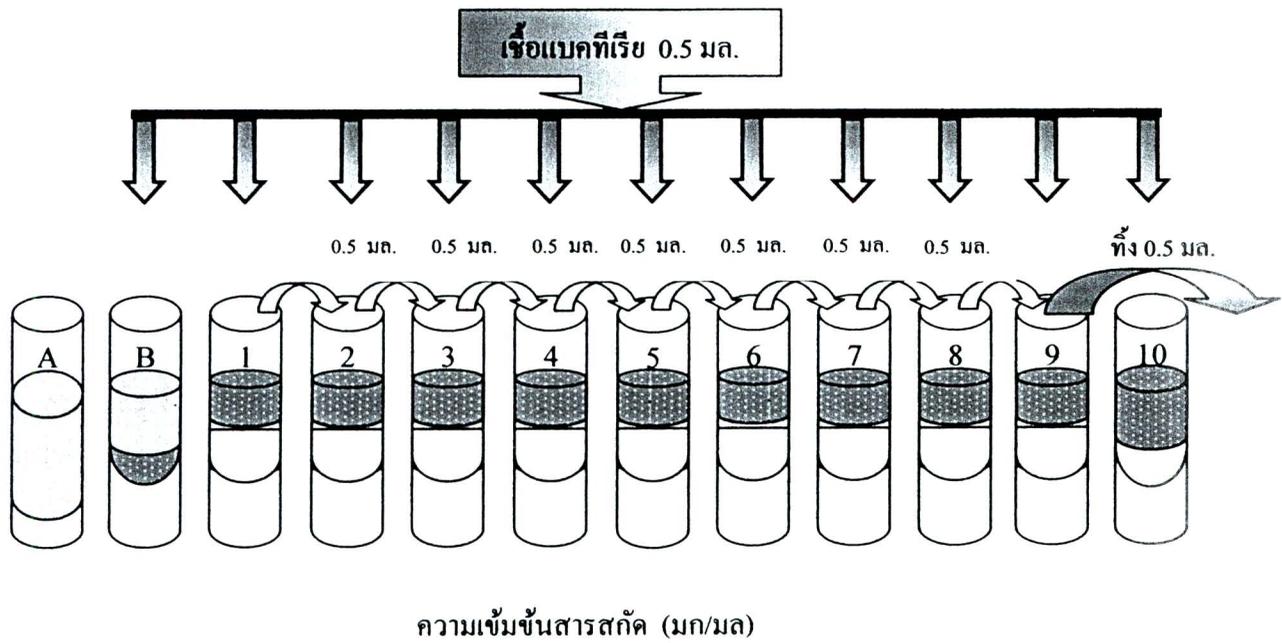
### วิธีการทดสอบ

เตรียมหลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิเมตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 12 หลอด ใช้เปิดดูอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ใส่ลงในหลอดทดลอง A, 1 – 12 หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ใช้เปิดดูสารสกัดลงในหลอดที่ A, B และ 1 หลอดละ 0.5 มิลลิลิตรผสมสารในหลอดทดลองให้เข้ากัน ใช้เปิดดูสารในหลอดที่ 1 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 2 ทำซ้ำข้างต้น ไปจนถึงหลอดที่ 9 ดังรูปที่ 3.6 เมื่อผสมสารละลายในหลอดที่ 9 เข้ากันดีแล้วใช้เปิดดูสารละลายทิ้งไป 0.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 10 จะมีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่มีสารสกัด จึงใช้เป็นตัวควบคุม (Positive control) เติมเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ลงไปทุกหลอด ยกเว้นหลอด A ซึ่งเป็น Negative control หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดทดลองทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16 – 18 ชั่วโมง

### การอ่านผลค่า MIC

เมื่อบ่มเชื้อจนครบ 16 – 18 ชั่วโมงแล้ว สังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญ หรืออาหาร

เลี้ยงเชื้อในหลอดไต อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่า MIC บันทึกหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

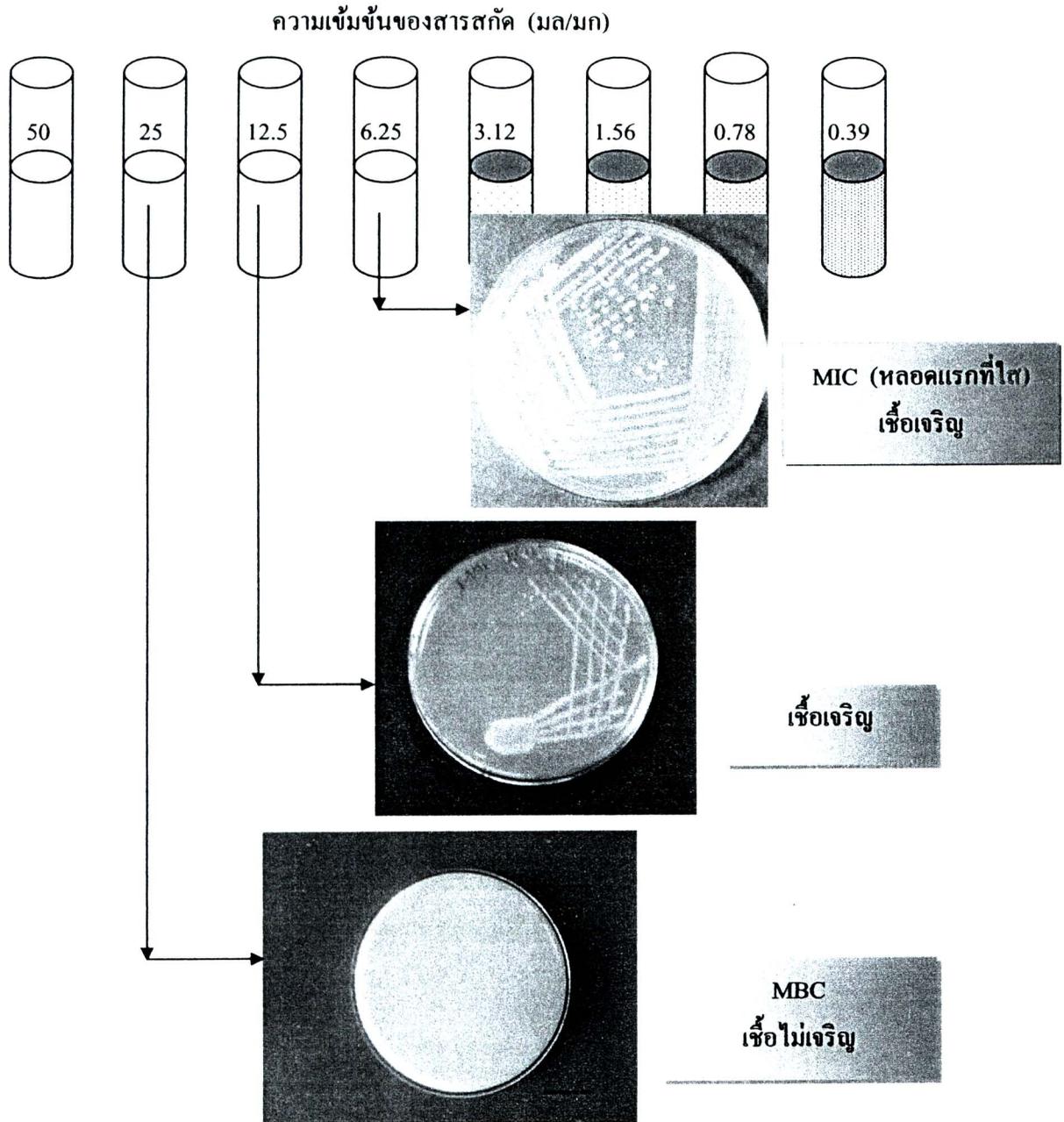


- |   |                                    |                              |
|---|------------------------------------|------------------------------|
|  | ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 0.5 มล. | หลอด A คือ Negative control  |
|  | ปริมาณสารสกัด/ยา 0.5 มล.           | หลอด 10 คือ Positive control |
|  | ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 0.5 มล.       |                              |

รูปที่ 3.6: แสดงวิธีการหาค่า MIC

6.3 การทดสอบการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC)

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เชื้อไม่เจริญในอาหารเหล่านั้น สามารถนำมาหาค่า MBC ได้ โดยนำหลอดที่ทำการทดสอบจากการหาค่า MIC หลอดที่ใสทุกหลอดไป streak plate บนจานอาหารแข็ง TSA ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ก็จะไม่พบการเจริญของเชือบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าเชื้อไม่ตายก็จะพบการเจริญของเชือบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7: แสดงวิธีการหา MBC

## ตอนที่ 7: การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

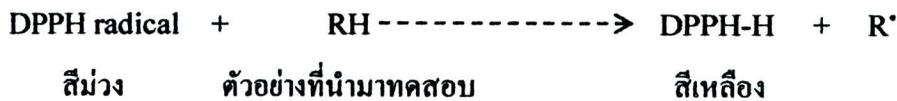
### การประเมินประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชัน

การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหลอดทดลอง (in vitro antioxidation test) ทำได้หลายวิธี เช่น 1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid (DETBA) method, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method, conjugated diene (CD) method, reducing power, ความสามารถในการขจัด 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) เป็นต้น ในงานวิจัยนี้ใช้ วิธีประเมินประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชัน 2 วิธี คือ

1. ความสามารถในการขจัด 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH method)
2. การยับยั้งการเกิด lipid peroxidation โดยใช้ Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS method)

### การวัดความสามารถในการขจัด 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH method)

วิธีการวัดทำได้โดยการใช้สารอนุมูลอิสระซึ่งเสถียร และมีสี คือ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) โดยมีปฏิกิริยา ดังนี้



โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH radical วัดสีม่วงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 540 nm (ใช้ microplate reader) ถ้าสารต้านอนุมูลอิสระยังมีประสิทธิภาพดีเท่าใดสีม่วงของ DPPH radical ก็จะลดลงได้เร็วยิ่งขึ้นทำให้เราสามารถตรวจสอบประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชันที่มีอยู่ได้ว่า สารใดมีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันได้ดีกว่า

### การยับยั้งการเกิด lipid peroxidation โดยใช้ thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS method)

เป็นการวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการออกซิไดซ์ไขมัน คือ malondialdehyde (MDA) ซึ่งสามารถเกิด complex กับ thiobarbituric acid (TBA) ได้สารประกอบที่ให้สีชมพู โดยมีปฏิกิริยาดังนี้



โดยจะวัดค่าการดูดกลืนแสงของ MDA-TBA<sub>2</sub> complex ให้สีชมพูที่ความยาวคลื่น 540 nm ถ้าสารต้านอนุมูลอิสระยังมีประสิทธิภาพดีเท่าใด สีชมพูของ MDA-TBA<sub>2</sub> ก็จะมีน้อยทำให้เราสามารถตรวจสอบประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ได้ว่า สารใดมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่ากัน

### วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

#### 1. ความสามารถในการขจัด 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl radical (DPPH method)

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 167  $\mu$ M ใน microplate

↓  
 เตรียมสารละลายตัวอย่าง (sample) ที่ละลายด้วย absolute ethanol ปริมาณ 20  $\mu$ l  
 ผสมให้เข้ากันและเริ่มจับเวลาทันที

↓  
 ทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance, Ab)  
 ที่ความยาวคลื่น 540 nm

↓  
 นำค่าที่ได้ คำนวณ % การยับยั้ง (% inhibition)

↓  
 สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition  
 และความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง

↓  
 คำนวณหาค่าความเข้มข้นที่สามารถขจัด DPPH radical  
 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC<sub>50</sub>)

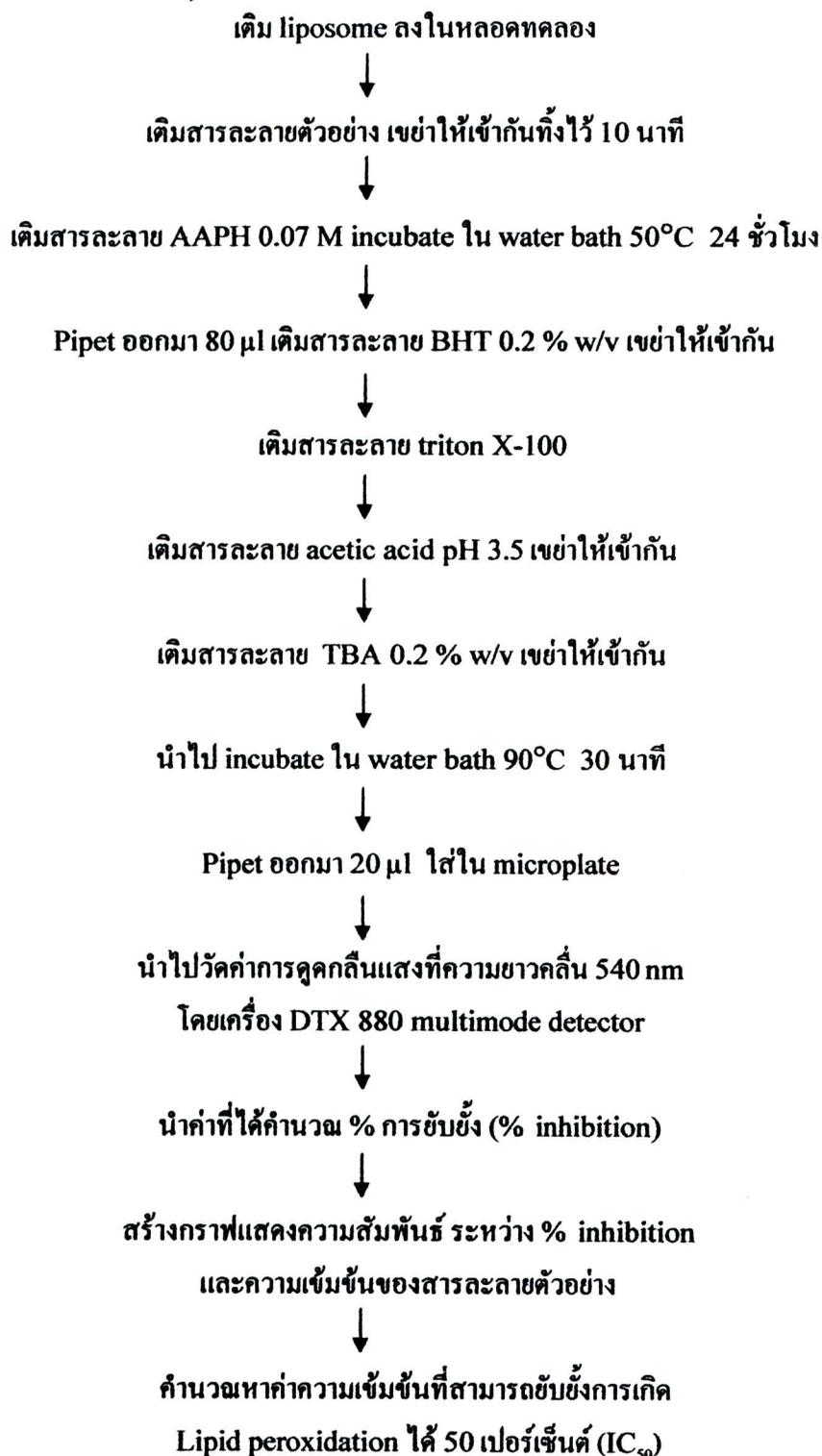
#### การคำนวณ % inhibition

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[(\text{Ab. positive control} - \text{Ab. negative control}) - (\text{Ab. Sample} - \text{Ab. blank})]}{[(\text{Ab. positive control} - \text{Ab. negative control})]} \times 100$$

#### หมายเหตุ

1. Positive control ประกอบด้วย absolute ethanol+สารละลาย DPPH
2. Negative control ประกอบด้วย absolute ethanol
3. Sample ประกอบด้วย สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน+สารละลาย DPPH
4. Blank ประกอบด้วย สารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน+absolute ethanol
5. สารมาตรฐาน ได้แก่ kaempferol quercetin และ BHT

## 2. ความสามารถในการยับยั้งการเกิด Lipid peroxidation โดยใช้ Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS method)



**การคำนวณ % inhibition**

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[(\text{Ab. positive control}-\text{Ab. negative control})-(\text{Ab. Sample}-\text{Ab. blank})]}{[(\text{Ab. positive control}-\text{Ab. negative control})]} \times 100$$

**หมายเหตุ**

1. Positive control ประกอบด้วย liposome+absolute ethanol
2. Negative control ประกอบด้วย phosphate buffer+absolute ethanol
3. Sample ประกอบด้วย สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน+liposome
4. Blank ประกอบด้วย สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน+phosphate buffer
5. สารมาตรฐาน ได้แก่ kaempferol, quercetin และ BHT