บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารประกอบโคออร์ดิเนชันบางชนิดที่มีลิแกนด์พอลีเอซาวงใหญ่ ในครั้งนี้มีวัสดุอุปกรณ์ สารเคมี เครื่องมือที่ใช้ และวิธีการศึกษา ดังนี้

วัสดุ และอุปกรณ์

1. บีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร
2. หลอดหยด
3. แท่งแก้วคนสาร
4. กระจกนาฬิกา
5. จุกยาง
6. ปิเปต ขนาด 10 มิลลิลิตร
7. ช้อนตักสาร
8. พาราฟิล์ม
9. กระดาษพีเอช
10. เตาอบ
11. เตาให้ความร้อน
12. ขวดไวอัล
13. หลอดทดลอง
14. น้ำกลั่น
15. แท่งแม่เหล็กคนสาร
16. กระดาษกรอง
17. ชุดรีฟลักซ์สาร
18. ขวดก้นกลม ขนาด 50 มิลลิลิตร
19. จานเพาะเชื้อ
20. ปิเปตขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร
21. ไมโครปิเปต
22. ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ
23. ตู้ปลอดเชื้อ
24. ตู้เพาะเชื้อ
25. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
26. อะลูมิเนียมฟอยล์
27. เครื่องชั่งสารเคมี ความละเอียด 4 ตำแหน่ง
28. กระดาษตาปลา ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

สารเคมี

1. คอปเปอร์(II) อะซีเตด มอนอไฮเดรต [$Cu(CH_3COO)_2{\cdot}H_2O$] มวลโมเลกุลเท่ากับ 199.65 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent ความบริสุทธิ์ $\geq$ 98.0 % บริษัท Sigma - Aldrich

2. นิกเกิล(II) อะซีเตด เตตระไฮเดรต [$Ni(CH_3COO)_2{\cdot}4H_2O$] มวลโมเลกุลเท่ากับ 248.84 กรัมต่อโมล เกรด puriss. p.a ความบริสุทธิ์ $\geq$ 98.0 % บริษัท Sigma - Aldrich

3. 1,2 - ไดอะมิโนโพรเพน (1,2 - Diaminopropane ; $C_3H_{10}N_2$) มวลโมเลกุลเท่ากับ 74.12 กรัมต่อโมล ความหนาแน่น 0.87 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ความบริสุทธิ์ $\geq$ 99.0 % บริษัท Aldrich

4. แอลฟา-เมทิลเบนซิลลามีน (α - methylbenzylamine ; $C_8H_{11}N$) มวลโมเลกุลเท่ากับ 121.18 กรัมต่อโมล ความหนาแน่น 0.94 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ความบริสุทธิ์ $\geq$99.5 % บริษัท Aldrich

5. เอทานอล (Ethanol ; C_2H_5OH) มวลโมเลกุลเท่ากับ 46.07 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent ความบริสุทธิ์ $\geq$99.5 % บริษัท Aldrich

6. ฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde ; CH_2O) มวลโมเลกุลเท่ากับ 30.03 กรัมต่อโมล เกรด ACS reagent ความเข้มข้น 37.0 %wt. บริษัท Sigma - Aldrich

7. กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 70% (Perchloric acid ; $HClO_4$) เกรด ACS reagent บริษัท Sigma - Aldrich

เครื่องมือที่ใช้

1. ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (FT-IR) ยี่ห้อ Perkin Elmer เตรียมโดยวิธีอัดสารตัวอย่างเป็นแผ่น (Disc) โดยผสมสารตัวอย่างกับโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) แล้วนำไปวิเคราะห์ในช่วงเลขคลื่น 4000 – 400 cm^{-1}

2. อัลตราไวโอเลต - วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis) ยี่ห้อ Shimadzu UV - 1601 เตรียมสารตัวอย่างละลายในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ในช่วงแสงที่ตามองเห็น (Visible) ช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 - 800 นาโนเมตร

3. วิเคราะห์ธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน (CHN Analyzer) ยี่ห้อ Thermo Quest รุ่น FlashEA 1112 ใช้สำหรับวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ปริมาณธาตุ C, H และ N ในสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่สังเคราะห์ได้ เพื่อยืนยันมวลโมเลกุลของสารและโครงสร้างที่ถูกต้อง

4. ลิคควิดโครมาโทกราฟี - แมสสเปกโทรมิเตอร์ (LC-MS) ยี่ห้อ Micromass U.K. ใช้สำหรับวิเคราะห์หามวลโมเลกุลที่ถูกต้อง

วิธีการทดลอง

ตอนที่ 1 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันบางชนิดที่มีลิแกนด์พอลีเอซาวงใหญ่

1. ชั่งน้ำหนัก คอปเปอร์(II) อะซีเตด มอนอไฮเดรต 1.9970 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นคนสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ได้สารละลายสีเขียว

2. ปิเปต 1,2-ไดอะมิโนโพรเพน ปริมาตร 1.30 มิลลิลิตร ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ได้สารละลายใสไม่มีสี

3. นำสารละลายที่เตรียมได้ในข้อ 2. ค่อย ๆ หยดลงในสารละลายข้อ 1. จากนั้นคนสารละลายต่อไปเรื่อย ๆ ประมาณ 30 นาที สารละลายจะเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเป็นสารละลายสีม่วงเข้ม

4. ปิเปต ฟอร์มัลดีไฮด์ ปริมาตร 2.20 มิลลิลิตร ค่อย ๆ หยดลงในสารละลายที่ได้จากข้อ 3. จากนั้นคนสารละลายต่อไปเรื่อย ๆ ประมาณ 30 นาที สารละลายจะเปลี่ยนแปลงจากสีม่วงเข้มเป็นสารละลายสีม่วง

5. ปิเปต แอลฟา-เมทิลเบนซิลลามีน ปริมาตร 1.27 มิลลิลิตร ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ค่อย ๆ หยดลงในสารละลายจากข้อ 4. จากนั้นคนสารละลายต่อไปเรื่อย ๆ ประมาณ 30 นาที สารละลายจะเปลี่ยนแปลงจากสีม่วงเป็นสารละลายสีม่วงเข้ม และรีฟลักซ์สารละลายเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

6. กรองสารละลายและหยด 70% กรดเปอร์คลอริกที่มากเกินพอ จนสารละลายเกิดการตกตะกอน

7. แยกตะกอนและสารละลายออกจากกันโดยการกรอง นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

8. คำนวณหาค่าร้อยละของผลผลิตที่ได้ (% Yield)

9. สังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันที่มีลิแกนด์พอลีเอซาวงใหญ่ เหมือนกับข้อ 1 - 8 แต่เปลี่ยนจาก คอปเปอร์(II) อะซีเตต มอนอไฮเดรต เป็น นิกเกิล(II) อะซีเตต เตตระไฮเดรต

ตารางที่ 1 สารตั้งต้นที่ใช้สังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันที่มีลิแกนด์พอลีเอซาวงใหญ่ทั้ง 2 ชนิด

เกลือโลหะแทรนซิชัน	อนุพันธ์ไดเอมีน	แอลดีไฮด์	เอมีนชนิดปฐมภูมิ
คอปเปอร์(II)	1,2-ไดอะมิโนโพรเพน	ฟอร์มัลดีไฮด์	แอลฟา-เมทิลเบนซิลลามีน
นิกเกิล(II)	1,2-ไดอะมิโนโพรเพน	ฟอร์มัลดีไฮด์	แอลฟา-เมทิลเบนซิลลามีน

ตอนที่ 2 วิเคราะห์คุณลักษณะของสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่มีลิแกนด์พอลีเอซาวงใหญ่

นำสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่มีลิแกนด์พอลีเอซาวงใหญ่ ในตอนที่ 1 มาศึกษาสมบัติทางกายภาพด้วยเครื่องมือต่าง ๆ ดังนี้

1. ฟูเรียทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ ศึกษาลักษณะการสั่นพันธะในสารตัวอย่าง และบอกหมู่ฟังก์ชันที่ได้จากการเลขคลื่น (Wavenumber ; cm^{-1})

2. อัลตราไวโอเลต - วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV - Vis) ช่วงความยาวคลื่น 400 - 800 นาโนเมตร แสดงข้อมูลการเกิด d-d แทรนซิชันของโลหะคอปเปอร์(II) และนิกเกิล(II)

3. คาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน (CHN Analyzer) ใช้สำหรับวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ปริมาณธาตุ C, H และ N ในสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ได้ เพื่อยืนยันมวลโมเลกุลของสารและนำเสนอโครงสร้างที่ถูกต้อง

4. ลิคควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรมิเตอร์ (LC-MS) ยืนยันข้อมูลมวลโมเลกุลและข้อมูลการแตกของโครงสร้าง

ตอนที่ 3 ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมบวก และแกรมลบกับสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่มีลิแกนด์พอลีเอซาวงใหญ่

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*

ใช้แบคทีเรียที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง และความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ต้องในปริมาณที่เหมาะสม โดยทั่วไปนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียปริมาณ 10^5-10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร วิธีการเตรียมมีดังนี้

1.1 เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ลงในอาหารเหลว ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร นำไปเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 นำเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ที่บ่มมาปรับความขุ่นของการเจริญเติบโตให้มีค่าความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFaland (McFaland Standard)

วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน McFaland มีดังนี้

- นำสารละลาย A (ละลายแบเรียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต 1.175 กรัม ในน้ำ 10.00 มิลลิลิตร) ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 9.00 มิลลิลิตร จากนั้น ปิเปตสารละลาย A ที่เจือจางลง 10 เท่านี้ ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B (ละลาย H_2SO_4 เข้มข้น ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ในน้ำ 99.00 มิลลิลิตร) ปริมาตร 99.50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีนำไปใส่ในหลอดฝาเกลียว ปริมาตรหลอดละ 10.00 มิลลิลิตร ปิดให้แน่น เก็บในที่มืดมีอายุการใช้งาน 6 เดือน ชนิดของหลอดแก้วที่ใส่สารละลายนี้ควรเป็นชนิดเดียวกับหลอดเชื้อแบคทีเรียเพื่อจะได้เปรียบเทียบความขุ่นกันได้ และก่อนใช้ต้องเขย่าสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อน (บุษกร อุตรภิชาต. 2549 : 258)

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

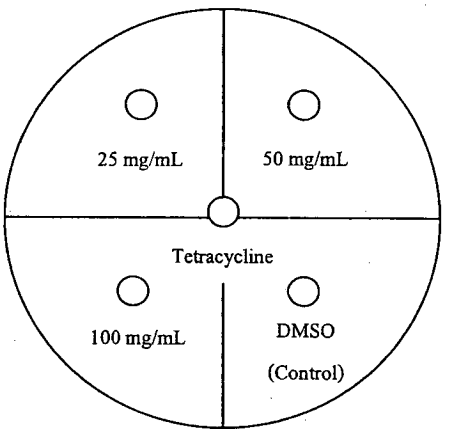
ในการทดสอบครั้งนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแบบแข็ง โดยวิธี Agar Diffusion โดยใช้อาหาร Nutrient Agar (NA) เทอาหารที่เตรียมได้ปริมาตร 20.00 มิลลิลิตร ลงในจานอาหาร มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางส่วนก้นจาน และฝาจานเท่ากับ 9 และ 10 เซนติเมตร ตามลำดับ จากนั้นวางทิ้งไว้ให้อาหารในจานแข็ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิธีการนี้จะได้อาหารแข็งที่มีความหนา 4 เซนติเมตร (บุษกร อุตรภิชาต. 2549 : 121)

3. การเตรียมสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่มีลิแกนด์พอลีเอซาวงใหญ่

นำสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่มีลิแกนด์พอลีเอซาวงใหญ่ นำมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อ 10 มิลลิลิตร ใช้ตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ในแต่ละความเข้มข้นทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำมาหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Derivation ; *SD.*)

4. วิธีศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ของสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่มีลิแกนด์พอลีเอซาวงใหญ่

4.1 เขียนที่จานอาหารแข็ง เพื่อระบุตำแหน่งที่จะวางแผ่นกระดาษตาปลาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรทั้งหมด 5 ตำแหน่ง ดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 ตำแหน่งการวางแผ่นกระดาษตาปลาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

4.2 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นไว้โดยมีปริมาณเชื้อประมาณ 10^5-10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วบิดให้แห้งพอหมาด ๆ กับข้างหลอดทดลอง จากนั้นทำการกวาดให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยลากเส้นผ่าศูนย์กลางจานเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วป้ายเป็นเส้นตั้งฉากผ่านเส้นที่ลากไว้ถี่ ๆ ให้ทั่วผิวหน้าแล้วหมุนจานเพาะเชื้อไปประมาณ 60 องศา แล้วป้ายเช่นกันทำเช่นนี้ 3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที เพื่อให้ส่วนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

4.3 การทดสอบสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่มีลิแกนด์พอลีเอซาวงใหญ่ โดยใช้กระดาษตาปลาปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ใช้ปากคีบ (Forceps) คีบกระดาษตาปลาวางบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้นแล้วกดเบา ๆ ที่ตำแหน่งที่กำหนดไว้

4.4 หยดตัวอย่างสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่มีลิแกนด์พอลีเอซาวงใหญ่ที่จะทดสอบลงบนแผ่นกระดาษตาปลาคนละตำแหน่ง ๆ ละ 20 ไมโครลิตร และหยดตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์เป็นตัวควบคุม และยาเตตระซัยคลิน จากนั้นนำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.5 การอ่านผล ให้วัดขนาดโซนใสที่เกิดขึ้น โดยวัดจากขอบข้างหนึ่งไปยังขอบอีกข้างหนึ่ง โดยให้ผ่านจุดศูนย์กลางของกระดาษ บันทึกในหน่วยมิลลิเมตร (อมรรัตน์ สีสุกอง และคณะ. 2550 : 33)