บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย

สารเคมี

- Acetic acid anhydride
- Conc. Hydrochloric acid
- Conc. Sulfuric acid
- Deionized water
- Dichloromethane AR (Methylene chloride AR)
- Dragendorff's reagent
- Ethyl acetate AR
- Ferric chloride TS
- 2% Gelatin solution
- Hexane AR
- Kedde reagent A
- Kedde reagent B
- 10% Lead acetate solution
- Lime water
- ชิ้น Magnesium
- Methanol AR
- 5% α-Naphthol reagent
- Silica gel 60 No. 7734
- Vanillin reagen

วัสดุและอุปกรณ์

- Glass column
- TLC plate (silica gel 60-F_{254})
- TLC tank
- NMR tube
- Rotary evaporator
- Fume hood
- Micropipette
- Water bath
- UV-Vis Spectrophotometer
- Nuclear Magnetic Resonance Spectrophotometer

วิธีวิจัย

1. การเก็บพืช เก็บใบของลำดวนดอยจากดอยตุง จังหวัดเชียงราย ในระหว่างเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคม 2549

2. การสกัดแยกสารบริสุทธิ์/สารสำคัญจากใบของลำดวนดอย

2.1 การสกัดใบลำดวนดอย

นำใบแห้ง 505.0 กรัมมาบดให้ละเอียดและหมักด้วยเมทานอล (2 ลิตร 3 ครั้ง) กรองและระเหยให้แห้งภายใต้ความดันต่ำจนได้สารสกัดเข้มข้นเมทานอล (40.94 กรัม, 8.1% ของน้ำหนักแห้ง) นำสารสกัดเข้มข้นเมทานอลมาแยกสกัดด้วยตัวทำละลายตามความมีขั้วจากต่ำไปสูง จนกระทั่งได้สารสกัดเฮกเซน (8.24 กรัม, 1.6% ของน้ำหนักแห้ง) สารสกัดไดคลอโรมีเทน (11.11 กรัม, 2.2% ของน้ำหนักแห้ง) และสารสกัดเอทิลอะซิเตด (5.31 กรัม, 1.0% ของน้ำหนักแห้ง) นำสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ไปเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์

2.2 การแยกสารสกัดชั้นเฮกเซนของใบ

สารสกัดชั้นเฮกเซนจำนวน 8.28 กรัม นำมาลงคอลัมน์ซิลิกา เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร ใช้อัตราส่วนของปริมาณสารสกัดต่อปริมาณซิลิกา คือ 1:30 กรัม ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่แบบเกรเดียนต์จากอัตราส่วนของ เฮกเซน:เอทิลอะซิเตด เป็น เอทิลอะซิเตด:เมทานอล (95:5→30:70) รวมส่วนของสารสกัดชั้นนี้ได้ 9 ส่วน คือ HL1(0.35 กรัม), HL2 (0.78 กรัม), HL3 (0.68 กรัม), HL4 (0.56 กรัม), HL5 (0.91 กรัม), HL6 (0.83 กรัม), HL7(1.14 กรัม), HL8 (1.02 กรัม), และ HL9 (0.62 กรัม) โดยส่วนสกัด HL2, HL5, และ HL7 สามารถตกผลึกได้สารบริสุทธิ์ MHL-1, MHL-2 และ MHL-3 ตามลำดับ

2.3 การแยกสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนของใบ

สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนจำนวน 8.5 กรัม นำมาลงคอลัมน์ซิลิกา เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร ใช้อัตราส่วนของปริมาณสารสกัดต่อปริมาณซิลิกา คือ 1:30 กรัม ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่แบบเกรเดียนต์จากอัตราส่วนของ เฮกเซน:เอทิลอะซิเตด เป็น เอทิลอะซิเตด:เมทานอล (99:1→1:99) รวมส่วนของสารสกัดชั้นนี้ได้ 9 ส่วน คือ DL1 (0.57 กรัม), DL2 (0.49 กรัม), DL3 (1.40 กรัม), DL4 (0.92 กรัม), DL5 (0.48 กรัม), DL6 (1.74 กรัม), DL7 (0.85 กรัม), DL8 (0.91 d), และ DL9 (0.44 กรัม) ซึ่งส่วนสกัด DL6 และ DL7 สามารถตกผลึกได้สารบริสุทธิ์ MDL1 และ MDL2

2.4 การแยกสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตดของใบ

สารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตดจำนวน 5.0 กรัม นำมาลงคอลัมน์ซิลิกา เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.75 เซนติเมตร ใช้อัตราส่วนของปริมาณสารสกัดต่อปริมาณซิลิกา คือ 1:30 กรัม ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่

แบบเกรเดียนต์จากอัตราส่วนของ ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล 99:1 ไปเป็น 1:99 รวมส่วนของสารสกัดชั้นนี้ได้ 11 ส่วน คือ EL1 (1.4 มิลลิกรัม), EL2 (13.9 มิลลิกรัม), EL3 (129.4 มิลลิกรัม), EL4 (0.15 กรัม), EL5 (0.20 กรัม), EL6 (0.25 กรัม), EL7 (1.05 กรัม), EL8 (0.70 กรัม), EL9 (0.80 กรัม), EL10 (0.32 กรัม) และ EL11 (1.33 กรัม) ซึ่งส่วนสกัด EL10 สามารถตกผลึกได้สารบริสุทธิ์ MEL-1

3. การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่ได้ด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี แมสสเปกโทรสโกปี และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ทั้งชนิดโปรตอน คาร์บอนและเทคนิคอื่น ๆ ที่จำเป็น

4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากใบของลำดวนดอย สำหรับสารบริสุทธิ์ที่มีปริมาณเพียงพอจะนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เบื้องต้น โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อไรทะเลและการยังยั้งการสร้างไฮฟา และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด คือ human epithelial carcinoma (HeLa), human leukemic monocyte lymphoma (U937) และ human hepatocellular liver carcinoma (HepG2) เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ (normal human lung fibroblast cells, MRC5)

4.1 ความเป็นพิษต่อไรทะเล (Brine Shrimp Lethality Assay)

การทดสอบความเป็นพิษต่อไรทะเล (*Artemia salina*) ดัดแปลงตามวิธีของ Meyer et al. (1982) และ Sam (1993) โดยการเตรียมน้ำทะเลเทียมที่ความเข้มข้น 3.8 กรัมต่อลิตร นำไข่ไรทะเล (*Artemia salina* L.) เลี้ยงในน้ำทะเลเทียม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนับไรทะเลจำนวน 10 ตัว ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายของสารบริสุทธิ์ โดยให้ไรทะเลอยู่ในสารละลายของสารบริสุทธิ์นาน 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนไรทะเลที่ตาย เพื่อคำนวณหา LC_{50} (lethality dose) คือ ความเข้มของสารละลายของสารบริสุทธิ์ที่ทำให้ไรทะเลตาย 50% โดยใช้โปรแกรม Finney และ SPSS

การทดสอบนี้เตรียมสารละลายของสารบริสุทธิ์ในน้ำทะเลเทียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1,000 100 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (แต่ละความเข้มข้นทำ 3 หลอดทดลอง)

4.2 การยับยั้งการสร้างไฮฟา (Hyphae Formation Inhibition (HFI) Assay)

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนไคเนส (Protein kinase) และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารบริสุทธิ์ดัดแปลงตามวิธีของ Waters et al. (2002) และ Yao et al. (2011) โดยใช้ *Streptomyces* 85E ที่เลี้ยงบน ISP4 agar plate เป็นเชื้อในการทดสอบ เมื่อนำ disc (ϕ 7 มม.) ที่มีสารบริสุทธิ์ 20 µg/disc วางบน plate ที่ 30°C นาน 30 ชม. แล้ววัด inhibition zone ซึ่งแสดงผลเป็น clear zone หรือ bald zone โดย clear zone หมายถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์ของ *Streptomyces* 85E ซึ่งแปรผลเป็นการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์

ส่วน bald zone แสดงถึงการยับยั้ง aerial hyphae formation แต่ไม่ได้ยับยั้งการเจริญของเชื้อซึ่งแปรผลเป็นการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนไคเนส

การทดสอบนี้ทำความเข้มข้นละ 2 ครั้ง และ inhibition zone ที่มากกว่า 9 มม.ถือว่าสารบริสุทธิ์มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนไคเนสหรือแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์

4.3 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (MTT Assay)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งดัดแปลงจากวิธีของ Mosmann (1983) โดยเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบมี 3 ชนิด คือ HeLa, U937 และ HepG2 โดยเตรียมเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้น 5 x 10^5 cells/well จากนั้นเติมสารละลายของสารบริสุทธิ์ใน DMSO ลงในแต่ละจานเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปอบนาน 24 ช.ม. ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm และ630 nm เพื่อคำนวณค่า IC_{50} (50% inhibition concentration) ของสารบริสุทธิ์ โดยมี positive control คือ 5-fluorouracil (5-FU) nm การทดสอบนี้ทำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง

หากสารบริสุทธิ์แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่นำมาทดสอบ จะทำการทดสอบเพิ่มเติมกับเซลล์ปกติ คือ normal human lung fibroblast cells (MRC5) เพื่อศึกษาความจำเพาะเจาะจงของความเป็นพิษต่อเซลล์