

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคองติงจากส่วนใบ

1. นำส่วนใบคองติงโดยนำใบที่มีส่วนของเส้นใบที่ฐาน ทำความสะอาดด้วยผงซักฟอก ผ่านน้ำประปาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ความเข้มข้น 5% ประมาณ 15 นาที โดยหยด tween 20 ประมาณ 2-3 หยด แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฟุ้งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละประมาณ 5 นาที

2. นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ซึ่งประกอบด้วยฮอร์โมน NAA และ BA ที่ระดับต่างกันดังนี้

สูตรที่ 1 MS+NAA 1 ppm+BA 1 ppm

สูตรที่ 2 MS+NAA 1 ppm+BA 2 ppm

สูตรที่ 3 MS+NAA 2 ppm+BA 1 ppm

สูตรที่ 4 MS+NAA 2 ppm+BA 2 ppm

3. นำไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ ประมาณ $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ความเข้มข้นของแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ วันละ 8-9 ชั่วโมง

4. ทำการย้ายเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์และบันทึกผลทุก 4 สัปดาห์

5. ตัดส่วนรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการเลี้ยงในสูตรที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ปริมาณมากเพียงพอต่อการนำไปตรวจสอบสารโคลชิซิน

2. การสกัดสารโคลชิซินจากรากเพาะเลี้ยง

1. นำรากเพาะเลี้ยงที่ทำการเลี้ยงไว้ 4 สัปดาห์ มาทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 2 วัน บดให้ละเอียดเก็บในภาชนะที่ปิดสนิทและในตู้ดูดความชื้น

2. ชั่งน้ำหนักรากเพาะเลี้ยงแห้งที่บดละเอียดแล้ว 1 กรัม ใส่ลงในขวดกั่นกลม

3. เติม ethanol 95% 10 ml ใส่เศษกระเบื้องลงไป 2-3 ชิ้น

4. ต่อเข้ากับ condensor และให้ความร้อนโดยใช้ heating mantle ที่อุณหภูมิ 70°C ทำการ reflux เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

5. ทิ้งไว้ให้เย็นจากนั้นกรองและปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml ด้วย ethanol 95%

6. นำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยวิธี HPLC และวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วย TLC

3. การสกัดสารโคลชิซินจากลำต้นใต้ดินจากธรรมชาติและเมล็ดจากธรรมชาติ

1. บดส่วนลำต้นใต้ดินและเมล็ดของคองคิงให้ละเอียด แล้วชั่งน้ำหนักอย่างละ 1 กรัม ใส่ในขวดก้นกลม
2. เติม ethanol 95% 10 ml ใส่เศษกระเบื้องลงไป 2-3 ชิ้น
3. ต่อเข้ากับ condensor และให้ความร้อนโดยใช้ heating mantle ที่อุณหภูมิ 70°C ทำการ reflux เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
4. ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นกรองและปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml ด้วย ethanol 95%
5. นำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยวิธี HPLC และวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วย TLC

4. การวิเคราะห์สารโคลชิซินเชิงคุณภาพโดยวิธีทาง Thin Layer Chromatography (TLC)

1. นำสารสกัดที่ได้จากรากพืชเลียง ลำต้นใต้ดินและเมล็ดจากธรรมชาติมา spot ลงบนแผ่น TLC silica gel GF 254 โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือ colchicine, 2-demethylcolchicine, 3-demethylcolchicine
2. นำแผ่น TLC ไปวางใน tank ที่มี solvent system คือ
 - chloroform:acetone:diethylamine ในอัตราส่วน 5:4:1
 - benzene:ethylacetate:diethylamine:methanol ในอัตราส่วน 5:4:1:2
3. ทำให้แห้ง แล้วนำแผ่น TLC ไปส่อง UV light ทำการบันทึกผลพร้อมทั้งวัดค่า Rf value ทั้ง 2 system

5. การวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

5.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อทำ standard curve

1. ชั่งสารมาตรฐานโคลชิซิน 0.01 กรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 ml ละลายด้วย ethanol 95% แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 µg/ml
2. นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 25, 12.5, 6.25, 3.12 และ 1 µg/ml

5.2 สภาพเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

mobile phase	28% acetonitrile in water
UV detector	350 nm
flow rate	0.80 ml/min
injection volume	20 µl
column	Nova-Pak C18 3.9x1.50 mm

5.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์สารมาตรฐาน

1. นำสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 25, 12.5, 6.25, 3.12 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ในปริมาตร 20 μl
2. บันทึกผลโดยวัดความสูงของ peak ที่ได้ ในแต่ละความเข้มข้น นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง peak height (cm) กับความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)

5.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. สารสกัดรากพะยอมและลำต้นไต้ดินจากธรรมชาติที่เตรียมได้จากข้อ 2 และ 3 นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 μl
2. บันทึกผลโดยวัดความสูงของ peak แล้วนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน