บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. ตู้อบ
2. เครื่องบดไฟฟ้า (Blender)
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
4. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator)
5. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์
6. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
7. ชุดกรองสาร

3.1.2 สารเคมี

1. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
2. ethanol
3. Methanol
4. Hexane
5. Ethylacetate
6. Rifampicin
7. Streptomycin
8. Isoniazid
9. Ofloxacin

3.2 พืชสมุนไพร และจุลชีพ

3.2.1 มะเดื่อ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : Ficus hispida Linn. f.
ชื่อวงศ์ : MORACEAE

3.2.2 เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการวิจัย

1. เซลล์มะเร็งในช่องปาก (human mouth carcinoma : KB)
2. เซลล์มะเร็งปอด(human small cell lung cancer : NCI-H187)
3. เซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer : MCF-7)

3.2.3 เชื้อวัณโรค

เชื้อวัณโรคที่ใช้ในการวิจัยคือ *Mycobacterium tuberculosis* ($H_{37}Ra$)

3.2.5 เชื้อมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรีย ที่ใช้ในการศึกษา คือ *Plasmodium falciparum*

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

1. ทำการสำรวจอนุกรมวิธานของพืชสมุนไพรตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองคือ มะเดื่อและรับรองพืชสมุนไพรตัวอย่างโดยผู้เชี่ยวชาญทางพฤกษศาสตร์(Voucher Specimens)

2. นำส่วนของมะเดื่อ มาทำความสะอาด หั่นให้เล็กแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45°C

3. นำส่วนของมะเดื่อที่แห้งแล้ว ไปบดให้ละเอียด ด้วยเครื่องบดไฟฟ้า (Blender) และนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การสกัดสารพืชสมุนไพร

การสกัดสารที่มีองค์ประกอบสำคัญจากมะเดื่อใช้เทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction โดยการหมัก(Maceration) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปยังมีขั้วสูงคือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ ดังนี้

1. ส่วนของมะเดื่อ ที่บดละเอียดมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน 0.5 Kg แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายคือเฮกเซน ในภาชนะปิด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

2. นำของผสมมากรองแยกสารสกัดและกากออกจากกัน โดยส่วนที่เป็นสารสกัดนำไประเหยแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 °C จะได้สารสกัดหยาบ(Crude extract) ของชั้นเฮกเซน ชั่งน้ำหนักและเก็บไว้ทดสอบในขั้นต่อไป

3. ส่วนที่เป็นกากนำไปผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้นคือเอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ และทำการสกัดสารโดยใช้วิธีเดียวกันกับตัวทำละลายเฮกเซน

3.3.3 การตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี

1. Cardiac glycosides: ภายในโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วย steroids nucleus, unsaturated lactone ring และ rare sugar ทั้งสามส่วนนี้มีความสำคัญในการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ การตรวจสอบแต่ละส่วนในโครงสร้างทำได้ดังนี้

1.1 Steroid nucleus ใช้วิธี Liebermann-Burchard test ให้สีฟ้าหรือเขียว สารทดสอบต้องแห้งและปราศจากน้ำ

1.2 Unsaturated lactone ring ตรวจสอบด้วย Kedde reagent หรือ Raymond reagent ให้สีม่วงน้ำเงิน หรือ Baljet reagent ให้สีส้มแดง

1.3 Deoxy sugar ตรวจสอบด้วย Killer-Kailiani test ให้วงแหวนสีม่วงแดงที่รอยต่อระหว่างชั้นของเหลว

ทั้งนี้สารประกอบหลายชนิดในกลุ่ม sesquiterpene lactones และ cardiac glycosides ที่มีโครงสร้างเป็น unsaturated lactones จะให้ผลบวกกับการทดสอบด้วย Kedde reagent, Baljet reagent และ Legal reagent

2. Saponin glycosides: สารในกลุ่ม saponins มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิวเมื่อละลายน้ำจึงเกิดฟองได้ มีโครงสร้างหลัก 2 ชนิด คือ steroidal saponins และ triterpenoid saponins การตรวจสอบเบื้องต้น ทางพฤกษเคมีของสารในกลุ่มนี้

อาศัยการเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำ ฟองรูปหกเหลี่ยมจะคงอยู่นานกว่า 15 นาที และคุณสมบัติการทำให้เม็ดเลือดแดง แตกออก นอกจากนี้ยังตรวจสอบด้วย Liebermann-Burchard test โดย steroidal saponins ให้สีฟ้า-เขียว ในขณะที่ triterpenoid saponins ให้สีม่วงแดง

3. Anthraquinone glycosides: สารในกลุ่มนี้ประกอบด้วยส่วนของ aglycone ของ anthraquinones และน้ำตาล ซึ่ง anthraquinones มีคุณสมบัติละลายได้ดีในด่างแล้วเกิดเป็นสีชมพูหรือแดง ดังนั้นจึงไฮโดรไลซ์ anthraquinone glycosides ด้วยกรดหรือด่าง หรือ $FeCl_3$ หรือ sodium dithionate ให้กลายเป็น aglycone ของ anthraquinones แล้ว จึงสกัดออกมาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นนำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาทดสอบกับด่างจะพบสีชมพู-แดง การทดสอบนี้เรียกว่า Borntrager test

4. Flavonoids: ฟลาโวนอยด์แบ่งออกเป็น typical flavonoids, related flavonoids และ miscellaneous flavonoids

การตรวจสอบสารในกลุ่มนี้ ทำได้ดังนี้

4.1 Shibata's reaction หรือ Cyanidin test เป็นการตรวจสอบโครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์ หากมีโครงสร้างเป็นbenzo-pyrone ที่เป็นโครงสร้างส่วนสำคัญใน flavones, flavonols, flavanones, flavanonols และ isoflavones จะเกิดปฏิกิริยากับแมกนีเซียมโดยมีกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นช่วยละลายแมกนีเซียมและเร่งปฏิกิริยาได้ผลบวกเป็นสารละลายสีส้ม แดง หรือชมพู

4.2 Pew test ใช้หลักการเดียวกันกับ cyanidin test แต่ใช้สังกะสีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลบวกจะให้สารละลายเป็นสี ส้ม -แดง แต่สีที่เกิดขึ้นจางกว่าวิธี cyaniding test

4.3 Ferric chloride (FCl_3) test เป็นการตรวจสอบ phenolic group ในโครงสร้าง ซึ่งพบได้ใน flavonoids, tannins, coumarins, quinones และสารที่ประกอบด้วย phenolic group ผลบวกจะเกิดตะกอนหรือสารละลายมีสีเขียว น้ำเงิน หรือดำ

4.4 Bromine water เป็นการตรวจสอบสารในกลุ่ม proanthocyanidins ที่เป็นองค์ประกอบใน condensed tannins ผลบวกเกิดตะกอนสีเหลือง ซึ่ง flavonoids กลุ่มอื่นๆ

4.5 Molisch's test เป็นการทดสอบสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต หากพบน้ำตาลซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ glycosides จะพบวง แหวนสีม่วงที่รอยต่อระหว่างชั้นของเหลว และในบางครั้งพบสีม่วงกระจายอยู่ทั่วไปในชั้นล่างที่เป็นชั้นกรดซัลฟิวริก เข้มข้น

4.6 การตรวจสอบโดยใช้สารละลายกรดและด่าง จะพบว่าฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงสีได้ตามสภาพความ เป็นกรดหรือด่าง หากเป็นสารกลุ่ม anthocyanins เมื่ออยู่ในสภาวะกรดจะให้สีแดง และในสภาวะด่างจะให้สีม่วง หรือน้ำเงิน หากเป็นสารกลุ่ม chalcones และ aurones เมื่ออยู่ในสภาวะกรดจะให้สีแดง และในสภาวะด่างจะให้สี ส้มหรือแดง ทั้งนี้สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์จะให้ผลบวกกับ Shinoda test และกรดซัลฟิวริก ในขณะที่สารพวก polyphenols ชนิดอื่นก็สามารถให้ผลบวกลวงกับสารทดสอบเหล่านี้

5. Tannins: เป็นสารจำพวก polyphenols แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1). hydrolyzable tannins ที่โครงสร้างทางเคมี ประกอบด้วย phenolic acids และน้ำตาล เมื่อต้มในกรดหรือใช้เอนไซม์จะกลายเป็นกรดและน้ำตาล 2). condensed tannins มีโครงสร้างเป็น oligomer หรือ polymer ที่มี monomer

เป็น catechins (flavan-3-ol) ซึ่งอาจจัดเป็นproanthocyanidins ของ flavonoids เมื่อนำไปต้มกับกรด จะเกิดตะกอนสีแดงที่เรียกว่า phloba phene จึงเรียกสารเหล่านี้ว่า phlobatannins และ 3). pseudotannins เป็นสารเชิงเดี่ยวมีขนาดโมเลกุลเล็ก แทนนินมีฤทธิ์ฝาดสมานและตกตะกอนอัลคาลอยด์ได้ จึงทำให้อัลคาลอยด์หมดฤทธิ์ทางชีวภาพ การตรวจสอบแทนนินอาศัยการเกิดตะกอนระหว่างแทนนินกับ gelatin, lead acetate, zinc acetate หรืออัลคาลอยด์ ได้

5.1 การตรวจสอบด้วย gelatin สารจำพวก true tannins จะเกิดตะกอนคงตัวกับ gelatin แต่สารจำพวกpseudotannins จะเกิดตะกอนที่ไม่คงตัว

5.2 การตรวจสอบด้วย bromine water หากเป็น condensed tannins จะเกิดสีเหลืองกับ bromine

5.3 การตรวจสอบด้วย $FeCl_3$ หากเป็น hydrolyzable tannins จะเกิดตะกอนสีน้ำเงิน ในขณะที่ condensed tannins จะเกิดตะกอนสีเขียว สำหรับสารอื่น ๆ ที่ประกอบด้วย phenolic group เช่น flavonoids และ coumarins จะเกิดสี เขียวหรือน้ำเงิน ในขณะที่สารพวก polyphenols อื่น ๆ จะเกิดตะกอนสีน้ำตาลกับสารละลาย ferric chloride (5%) ในน้ำหรือเอทานอล

5.4 การตรวจสอบด้วย vanillin reagent และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น พบว่า condensed tannins จะเกิดสีแดง

6. Coumarins: เป็นสารที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น benzo-□-pyrone หรือ phenylpropanoid lactone หรือ benzopyran-2-one ตรวจสอบด้วยการนำสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์มาละลายในเอธานอล แล้วกรอง จากนั้นนำไปชุบด้วยกระดาษ กรอง แล้วจึงหยดด้วย 10% NaOH จะพบการเรืองแสงที่ long wave UV (365 nm)

7. Cyanogenic glycosides: ทดสอบด้วยวิธี Grignard test และ Guaiac-copper sulfate paper

8. Alkaloids: อัลคาลอยด์เป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างและมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล true alkaloids ต้องมี ไนโตรเจนอยู่ใน heterocyclic ring และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อน สามารถตรวจสอบด้วยน้ำยาทดสอบเบื้องต้น เช่น Dragendorff's reagent (potassium bismuth iodide) เกิดตะกอนสีแดงอิฐหรือสีส้ม Kraut's reagent (potassium bismuth iodide) เกิดตะกอนสีส้มน้ำตาลแดง Marme's reagent (potassium cadmium iodide) เกิด ตะกอนสีขาว และ Hager's reagent (picric acid) เกิดตะกอนสีเหลือง ทั้งนี้สารที่ใช้ตรวจสอบอัลคาลอยด์ เช่น Mayer reagent, Dragendorff reagent, Wagner reagent และ Ammonium reineckate จะให้ผลบวกลวงกับ coumarins, polyphenols, purines, amino acids, proteins และสารประกอบไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ ซึ่งมักพบได้ในสารสกัดจากพืช ในทางตรงกันข้ามอัลคาลอยด์ไม่ทุกชนิดที่อาจพบได้ในสารสกัดจากพืชจะให้ผลบวกกับสารทดสอบเหล่านี้ เพราะลักษณะเฉพาะหรือคุณสมบัติเฉพาะของโครงสร้างทางเคมี (structural idiosyncrasy

9. Sterols: สามารถทดสอบสเตอรอลด้วย Liebermann-Buchard test และ Salkowski reaction

10. Carbohydrates: สามารถตรวจสอบคาร์โบไฮเดรตได้ด้วย Molisch's test (การเกิดวงแหวนสีม่วงที่รอยต่อระหว่างชั้น ของเหลวกับ Molisch reagent) และ Aniline acetate reaction

3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง

การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก (KB-Oral cavity cancer) (อ้างจาก ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)โดยใช้วิธี Resazurin Microplate assay (REMA) ใช้ 0.5 % DMSO เป็น Negative control IC_{50} of Positive control คือ Ellipticine=0.325 μg/ml, Doxorubicine=0.147 μg/ml โดยทำการแปลผลดังนี้

ถ้าสามามารถต้านมะเร็งได้น้อยกว่าร้อยละ 90 แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง

ถ้าสามามารถต้านมะเร็งได้มากกว่าร้อยละ 90 แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็ง และจะรายงานผลเป็นค่า % inhibition

3.3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (Anti-Mycobacterium tuberculosis. anti-TB) (อ้างจาก ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) โดยใช้วิธี Green fluorescent protein microplate assay (GFPMA) และ ใช้ Negative control เป็น 0.5 % DMSO MIC of Positive control คือ Rifampicin = 0.003-0.012 μg/ml, Streptomycin=0.156-0.313 μg/ml Isoniazid=0.023-0.046 μg/ml, Ofloxacin=0.391-0.781 μg/ml โดยทำการแปลผลดังนี้

ถ้าสามามารถยับยั้งเชื้อได้น้อยกว่าร้อยละ 90 แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

ถ้าสามามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 90 แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค และจะรายงานผลเป็นค่า MIC (μg/ml)

3.3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อมาลาเรีย (Anti-malaria ; *Plasmodium falciparum*, K1 Stain) (อ้างจาก ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)โดยใช้วิธี Microculture Radioisotope Technique และ ใช้ Negative control เป็น 0.1% DMSO (Dimethyl sulfoxide) IC_{50} of Positive control คือ Dihydroartemisinine = 4.4 nM โดยทำการแปลผลดังนี้

ถ้าสามามารถยับยั้งเชื้อได้น้อยกว่าร้อยละ 50 แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

ถ้าสามามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 50 แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย และจะรายงานผลเป็นค่า IC_{50} (μg/ml)

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าร้อยละ และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.5 ระยะเวลาการทดลอง

1 ตุลาคม 2553 – 30 กันยายน 2554

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

1. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร
2. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ