บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 ครุภัณฑ์

ชนิดเครื่องมือ	แบบ-รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องเซนตริฟิวจ์	1. Top bench centrifuge Minor 35	MSE Ltd., England
	2. Refrigerated centrifuge Model PR-Z	IEC Ltd., England
เครื่องวัดพีเอช	PHM 83 Autocal PH meter	Radiometer, Copenhagen
เครื่องเขย่า	Vortex-Genic Model K-550 GE No. 18309	Scientific Industries, Inc., Bohemia, N.Y. 11716, USA.
เครื่องชั่ง	1. ทศนิยม 2 ตำแหน่ง Type 1507	Sartorius, Germany
	2. ทศนิยม 4 ตำแหน่ง Type 1702	Sartorius, Germany
เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์	Autoclave madel HA-3D	Hirayama Manufacturing Corporation, Japan
High Performance Liquid Chromatography	Liquid Chromatograph LC-3A Spectophotometer detecter SPD-1 ที่ UV 254 nm.	Shimadzu, Japan
กล้องจุลทรรศน์	Nikon UFX-II พร้อมกล้อง Nikon FX-35A	Nikon, Japan

ชนิดเครื่องมือ	แบบ-รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องระเหยสารแบบหมุน	RE111	Auchi., Switzerland
ตู้อบ	-	Memmert., Germany
ตู้อบสูญญากาศ	VT 5042 EK	Heraeus., Germany
ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ	-	ISSCO., Thailand

2.2 วัสดุและเคมีภัณฑ์

2.2.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลอง (Plant Material)

ต้นไข่เน่า (Vitex glabrata R.Br.) อายุ 7 ปี จากอำเภอบางเขน กรุงเทพมหานคร (ภาพที่ 3 ลักษณะและคุณสมบัติตามภาคผนวกที่ 1.) ส่วนของพืชที่ใช้ทดลองคือ ก.ชิ้นส่วนของใบ (leaf piece) ข.ชั้นของอีพิเดอร์มิส (epidermal layer) และ ค.ส่วนของต้น (stem section)

2.2.2 สารโครมาโตกราฟีเพื่อการวิเคราะห์

2.2.2.1 โครมาโตกราฟีแผ่นบาง (Thin-layer chromatography, TLC) ใช้สารซิลิกาเจล 2 ชนิดคือ

(1) สารซิลิกาเจล เอชเอฟ$_{254}$ (Silica gel G.) Art. 7739 ฉาบไว้บนแผ่นแก้วใสขนาด 10x20 ซม.และ 20x20 ซม.ความหนาของชั้นซิลิกาประมาณ 0.25 มม.

(2) สารซิลิกาเจล 60 เอฟ$_{254}$ (Silica Gel 60 F$_{254}$) Art. 5554 ฉาบสำเร็จรูปแล้วบนแผ่นอลูมิเนียม มีความหนาของซิลิกา 0.2 มม. เป็นผลิตภัณฑ์ที่ซื้อจากบริษัท E. Merck

2.2.2.2 โครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) ใช้คอลัมน์ Zorbax C$_{18}$ ขนาด 4.6 มม.x 25 ซม.

ภาพที่ 3 ต้นไข่เน่าที่ใช้เป็นพืชทดลอง

2.2.2.3 Sep-pak C_{18} Cartridge ภายในบรรจุด้วย octadecyl silane boned phase packing (BONDAPAK C_{18}) ผลิตจากบริษัท Waters Associates ประเทศสหรัฐอเมริกา เหมาะสมในการใช้แยกสารที่มีความเป็นขั้วสูงออกจากสารปนเปื้อนที่มีความเป็นขั้วสูงเช่นกัน

2.2.3 สารเคมี (chemical Reagents)

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อ(Surface sterilant)	
70 % เอธานอล	องค์การเภสัชกรรม
คลอรอกซ์(สารละลายที่มีโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl)0.525 % เป็นองค์ประกอบ)	ลีเวอร์บราเธอร์(ประเทศไทย)
สารควบคุมการเจริญเติบโต(Growth regulator)	
2,4-D(2,4-dichlorophenoxy acetic acid)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
BA (benzyladenine)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
สารเคมีในการย้อมเซลล์พืช(staining reagent)	
8-ไฮดรอกซีควิโนลิน (8-hydroxyquinoline)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
อะซิโตคาร์มีน (acetocarmine)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
อะซิโตออซีอีน (acetoorcein)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
กรดอะซิติค (acetic acid)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
เอธานอล (ethanol)	องค์การเภสัชกรรม
กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
สารมาตรฐานกลุ่มเอคไดสเตอโรน	
เบตา-เอคไดโซน (β-ecdysone)	อนุเคราะห์จากรศ.ดร.อภิชาต สุขสำราญ
แอลฟา-เอคไดโซน (α-ecdysone)	อนุเคราะห์จากรศ.ดร.อภิชาต สุขสำราญ
11 แอลฟา, 20-ไดไฮดรอกซีเอคไดโซน (11α,20-dihydroxyecdysone)	อนุเคราะห์จากรศ.ดร.อภิชาต สุขสำราญ
มาคีสเตอโรน เอ (makisterone A)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
โพลีโพดีน บี (polypodine B)	อนุเคราะห์จากรศ.ดร.อภิชาต สุขสำราญ
โพแนสเตอโรน เอ (ponasterone A)	อนุเคราะห์จากรศ.ดร.อภิชาต สุขสำราญ
สารที่ใช้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเบตา-เอคไดโซน	
โคเลสเตอรอล (cholesterol)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
เบตา-ซิโตสเตอรอล (β-sitosterol)	อนุเคราะห์จากรศ.ดร.นลิน นิลอุบล
สติกมาสเตอรอล (stigmasterol)	อนุเคราะห์จากรศ.ดร.นลิน นิลอุบล
เมวาโลนิก แอซิด (mevalonic acid)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
ทริพโตแฟน (tryptophan)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.

สารเคมีอื่นๆ ที่ใช้นอกจากที่กล่าวนี้ สั่งซื้อจากบริษัท Sigma Chemicals ประเทศสหรัฐอเมริกา บริษัท BDH Chemical Ltd. ประเทศอังกฤษ บริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ เป็นต้น

2.3 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ใช้สูตรอาหาร MS ของ Murashige and Skoog (1962) (ภาคผนวกที่ 3)

2.4 สภาวะมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture condition)

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 25 ± 2 °C ให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนท์ ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

2.5 การเตรียมอาหารแข็ง 1/2 MS.

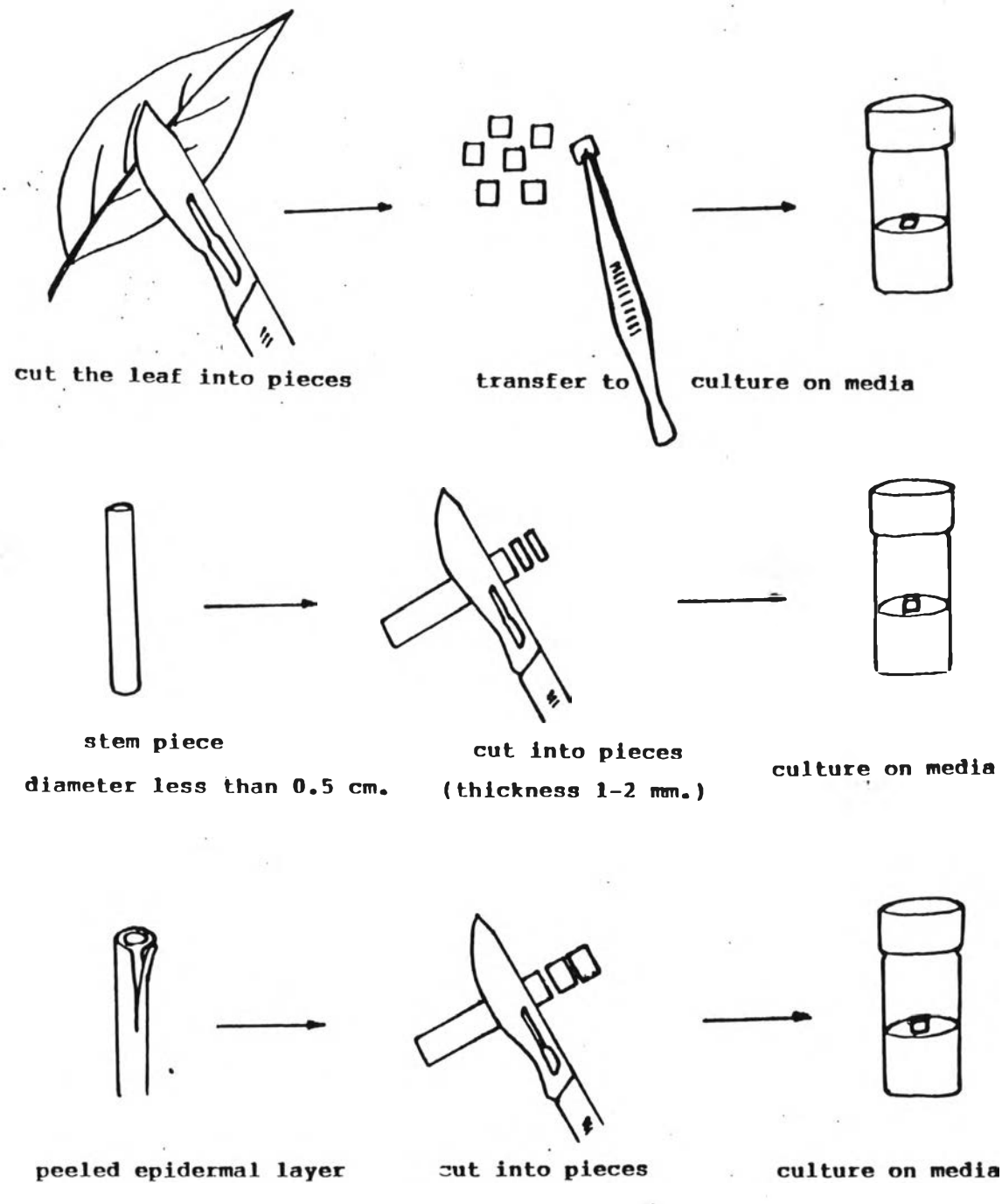
ดูดสารอาหารจาก stock ที่เตรียมไว้(ภาคผนวกที่ 5) เป็นครึ่งหนึ่งต่ออาหาร 1 ลิตรยกเว้นสารจำพวกวิตามิน ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 2 ลิตรที่มีน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร คนให้ละลาย นำไปปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดพีเอช ปรับให้ได้ pH 5.6 ด้วยกรดเกลือ (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) ถ่ายใส่ภาชนะที่ทนความร้อน เติมวุ้น 7 กรัม นำไปต้มจนวุ้นละลายทั่วกัน เทใส่ขวดสำหรับเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.6 การเตรียมและฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อพืช

ตัดตัวอย่างพืชทดลองขนาดประมาณ 6-8 นิ้วจากปลายยอด นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด ใช้มีดตัดส่วนที่ไม่ต้องการออก ทำความสะอาดอีกครั้งโดยการล้างหรือเช็ดด้วย เอธานอล 70% ตัดแยกใบออกจากกิ่ง(stem) ตัดกิ่งให้มีขนาดเล็กลง ความยาวประมาณ 1 นิ้วครึ่ง นำชิ้นส่วนของพืชไปฟอกฆ่าเชื้อในน้ำกลั่น(ฆ่าเชื้อแล้ว) ที่มี คลอรอกซ์ 10 % และทวีน-20 2 หยดต่อน้ำกลั่น 100 มล. เป็นเวลา 10 นาที และ คลอรอกซ์ 5% ที่มีทวีน-20 เป็นเวลา 15 นาที ล้างชิ้นส่วนพืชให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง ตัดส่วนใบให้มีขนาด 0.5 ซม.x 0.5 ซม. ลอกชั้นอีพิเดอร์มิส (epidermis) ออกจากกิ่งที่ฟอกสะอาดแล้วตัดให้มีขนาด 0.5 ซม.x0.5 ซม. และตัดกิ่งให้เป็นแว่นหนาประมาณ 0.2 ซม. นำชิ้นของเนื้อเยื่อทั้ง 3 ส่วน วางบนอาหารแข็ง 1/2 MS ที่เตรียมไว้ และนำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 4)

2.7 วิธีและอาหารมาตรฐานในการชักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัส

ทำการชักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัส (undifferentiated cell mass) ที่เกิดจากส่วนต่างๆของต้น นำเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้ตามวิธีข้อ 2.6 วางบนอาหารแข็ง 1/2 MS ที่



ภาพที่ 4 การตัดแยกชิ้นเนื้อเยื่อต้นไข่เน่าเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์

016757

เติม 2.4-D และ BA ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม เพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ติดตามสังเกตระยะเวลาของการเกิดแคลลัสและลักษณะแคลลัสตั้งแต่อายุประมาณ 1 สัปดาห์จนครบ 4 สัปดาห์ การเพาะเลี้ยงแคลลัสแบบต่อเนื่องทำได้โดยตัดแบ่งแคลลัสออกจากชิ้นเนื้อเยื่อเดิม ให้ได้ขนาดพอเหมาะ (0.4x0.4 ซม.) และถ่ายแคลลัสลงในอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ หรือแล้วแต่ช่วงเวลาที่ทำการทดลอง

2.8 การติดตามการเจริญของแคลลัส

การหาน้ำหนักสด ติดตามการเจริญของแคลลัสโดยการชั่งน้ำหนักแคลลัสสดในสภาพปลอดเชื้อด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง และนำชิ้นแคลลัสกลับไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเดิม ติดตามการเพิ่มของน้ำหนักทุกสัปดาห์

การหาน้ำหนักแห้ง ติดตามการเจริญของแคลลัสโดยสุ่มตัวอย่าง 10 ขวดที่น้ำหนักเริ่มต้นเท่ากัน ชั่งหาน้ำหนักสด จากนั้นนำไปอบในตู้อบแห้งจนน้ำหนักคงที่ ติดตามการเจริญทุกสัปดาห์

2.9 การศึกษาเซลล์

2.9.1 รูปร่างของเซลล์

นำแคลลัสจากเนื้อเยื่อทั้ง 3 ส่วน อายุ 4 สัปดาห์ มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ของบริษัท Nikon รุ่น UFX-II ขนาดกำลังขยาย 10 20 40 และ 100 เท่า

2.9.2 ขนาดของเซลล์

การวัดขนาดใช้ occular micrometer สวมติดกับกล้องจุลทรรศน์ของบริษัท Nikon รุ่น UFX-II ขนาดกำลังขยาย 20 และ 40 เท่า

2.9.3 โครโมโซมภายในเซลล์

นำแคลลัสประมาณ 0.02 กรัมแช่ในสารละลาย 8-hydroxyphenolene นาน 6 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่น ทำการตรึงลักษณะของโครโมโซมด้วยกรดอะซิติค-เอธานอล (1:3) 6 ชั่วโมง ดูดเซลล์หยดบนแผ่นสไลด์(1-2 หยด) ล้างกรดด้วยน้ำกลั่น ซับน้ำด้วยกระดาษชำระ ย้อมสีโดยแช่เซลล์ในกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มัล อุ่นโดยลนด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์ประมาณ 15 นาที ใช้เข็มเขี่ยกลุ่มเซลล์ให้กระจาย หยดน้ำกลั่น 2-3 ครั้งเพื่อ

ล้างกรดที่เหลือ ซับน้ำออกด้วยกระดาษชำระและหยด กรดอะซิติด 45% (1-2 หยด) ทิ้งไว้ 30 นาที ซับกรดออก หยดสี acetoorcein หรือ acetocarmine ปิด cover slip จากนั้นใช้กระดาษชำระพับปิดด้านบนของสไลด์ แล้วใช้มือกดบนกระดาษเพื่อให้เซลล์แยกจากกัน โดยระวังอย่าให้กระจกเลื่อน นำกระดาษที่ปิดออก ค่อยๆเคาะบน cover slip เพื่อให้เซลล์กระจายออก ลนไฟ และใช้กระดาษชำระซับส่วนเกินของสีออก นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้กำลังขยาย 100 เท่า

2.10 การเก็บตัวอย่าง

2.10.1 การเก็บตัวอย่างองค์ประกอบของพืช

ตัดตัวอย่างส่วนของต้นและเปลือกของต้นไข่เน่า ให้มีขนาดยาวประมาณ 2 นิ้วและ 1x2x0.2 นิ้ว และตัดแยกใบออกจากต้น ใส่ในถาดสังกะสี อบในตู้อบอุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนัก แล้วใช้เป็นน้ำหนักแห้งของสารตัวอย่าง

2.10.2 การเก็บตัวอย่างแคลลัส

แยกแคลลัสออกจากอาหารเพาะเลี้ยง ใส่ใน petridish ที่เตรียมไว้อบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 °ซ บันทึกน้ำหนัก แล้วใช้เป็นน้ำหนักแห้งของสารตัวอย่าง

2.11 การเตรียม anisaldehyde reagent

เติม anisaldehyde (p-methoxybenzaldehyde) 2 มล. ในสารละลายของเอธานอลสัมบูรณ์ 98 มล. น้ำกลั่น 2 มล. และกรดซัลฟูริคเข้มข้น 3 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วใส่ขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.12 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซน

2.12.1 สารสกัดจากองค์ประกอบส่วนต่างๆของต้นไข่เน่า

นำตัวอย่างแห้งส่วนใบ เปลือก และต้น ที่อบเตรียมไว้บดละเอียด หนัก 1 กรัม สกัดสารด้วย เอธานอล 95% 50 มล. โดยใช้ Soxhlet Apparatus ให้ความร้อนด้วย heating mantle เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ระเหยเอาตัวทำละลายส่วนใหญ่ออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน หลังจากนั้นนำไปอบต่อในตู้อบสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40 °ซ จนน้ำหนักคงที่ ปกติจะใช้เวลาประมาณ 12 ถึง 24 ชั่วโมงสำหรับตัวทำละลายประมาณ 5-8

มล. ละลายกลับด้วยเมธานอลสัมบูรณ์ (absolute methanol) 4 มล. นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (vortex) จากนั้นเซนตริฟิวด์เอาตะกอนออก สารละลายที่ได้นำไปวิเคราะห์ระดับของเบตา-เอคไดโซนได้โดยตรงหรือทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

2.12.2 สารสกัดจากแคลลัสไข่เน่า

สารสกัดจากแคลลัสส่วนต่างๆ ที่ผ่านการสกัดตามวิธีข้อ 2.12.1 และอบจนน้ำหนักคงที่ ละลายกลับด้วย เอธานอล 95% 4 มล. นำสารละลาย 1 มล. เขย่ากับเฮกเซน 2 มล. ด้วยเครื่องเขย่านาน 1 นาที เซนตริฟิวด์ 10 นาที ดูดชั้นเฮกเซนออก ทำซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดสารปนเปื้อนจำพวกไขมันและสารที่มีความเป็นขั้วต่ำ (Pimprikar, G. D., et al,1984) นำชั้นเอธานอลไปอบแห้งในตู้อบอุณหภูมิ 60° ซ ละลายกลับด้วยน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร นำมาผ่านคอลัมน์ sep-pak C_{18} ที่เตรียมไว้พร้อมไว้ก่อนแล้วด้วยการชะด้วยเมธานอล 5 มล. และน้ำกลั่น 5 มล. เพื่อกำจัดสารปนเปื้อนที่มีความเป็นขั้วสูง หลังจากทำการชะด้วยน้ำกลั่น 10 มล. เมธานอล 20% 10 มล. ชะต่อด้วย เมธานอล 80% 10 มล. เก็บชั้น เมธานอล 80% นำไปอบแห้งในตู้อบ 60° ซ ละลายกลับด้วยเมธานอลสัมบูรณ์ 0.5 มล.

2.13 การวิเคราะห์ชนิดสารเบตา-เอคไดโซนด้วย TLC

หยดสารสกัดและสารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซน บนแผ่นโครมาโตกราฟพีแผ่นบางที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล เอชเอฟ$_{254}$ และซิลิกาเจล 60 เอฟ$_{254}$ นำไปแยกในภาชนะแก้วที่มีคลอโรฟอร์ม-เมธานอล (3:1) เป็นตัวชะ สังเกตผลด้วยตาเปล่า ติดตามผลการแยกเบื้องต้นโดยส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเลต 254 นาโนเมตร วงกลมแสดงตำแหน่งของสารแล้วนำแผ่น TLC ที่ได้ไปฉีดพ่น (spray) ด้วย anisaldehyde-EtOH-H_2SO_4 แล้วอังให้ร้อนบนแผ่นให้ความร้อน (hot plate) สังเกตตำแหน่งและการเปลี่ยนแปลงสีของตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซนภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์

2.14 การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารกลุ่มเอคไดสเตอรอยด์ด้วยเทคนิค HPLC

การศึกษาเพื่อยืนยันว่าผลิตภัณฑ์จากเนื้อเยื่อพืชส่วนต่างๆ และจากแคลลัสเป็นสารเบตา-เอคไดโซน ทำได้โดยเติมสารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซนลงในสารละลายผลิตภัณฑ์ ซึ่งเตรียมได้ตามวิธีข้อ 2.12 แล้วจึงนำมาตรวจวิเคราะห์ เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน

(internal standard) แอลฟา-เอคไดโซน 11 แอลฟา,20-ไดไฮดรอกซีเอคไดโซน มาคีสเตอโรน เอ โพลีโพดีน บี และโพแนสเตอโรน เอ ด้วยเครื่อง HPLC Shimadzu, liquid Chromatographic LC-3 ที่มีขนาดของคอลัมน์เท่ากับ 4.6 มม.x 25 ซม. สารดูดซับที่ใช้ (absorbant) คือ Dupont Zorbax, ODS ตรวจสอบสารด้วยเครื่องตรวจสอบ (detector) UV monitor ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

2.15 <u>การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเบตา-เอคไดโซน ในองค์ประกอบของต้นไข่เน่าและแคลลัสโดยเทคนิค HPLC</u>

วิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซนโดยเทคนิค HPLC ดัดแปลงจากวิธีของ I.D. Wilson และคณะ (1982) เปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟกับสารละลายมาตรฐานเบตา-เอคไดโซนหรือมาคีสเตอโรน เอ (internal standard) สำหรับการวิเคราะห์สภาวะและระบบของการวิเคราะห์แปรผันตามชนิดของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง โดยใช้ขนาดของคอลัมน์ ชนิดของตัวดูดซับและเครื่องตรวจสอบโครมาโตแกรมในระบบเดียวกัน กับการวิเคราะห์ชนิดของเอคไดสเตอรอยด์ตามข้อ 2.14 ซึ่งมีหลักการวิเคราะห์ 2 แบบคือ

<u>แบบที่ 1</u>

ปริมาณเบตา-เอคไดโซนสำหรับส่วนชั้นอีพิเดอร์มิส เปลือกและต้น รายงานเป็นค่าเปอร์เซนต์ของเบตา-เอคไดโซนต่อสารมาคีสเตอโรน เอ

$$= \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟของเบตา-เอคไดโซน ในโครมาโตแกรม}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของมาคีสเตอโรน เอ มาตรฐาน}} \times 100$$

(<u>หมายเหตุ</u> การวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซนทุกครั้ง ใช้ปริมาณสารมาตรฐานมาคีสเตอโรน เอ คงที่ คือ 65 ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร)

<u>แบบที่ 2</u>

รายงานเป็นค่าไมโครกรัมของเบตา-เอคไดโซน ซึ่งคำนวณได้จากเส้นกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 6 และ 7) เมื่อใช้สารมาตรฐานเบตา-เอคไดโซน ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ด้วยวิธีการและสภาวะเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซนในสารตัวอย่าง ใช้กับตัวอย่างส่วนใบและแคลลัสจากเนื้อเยื่อต้นไข่เน่า

2.16 การสกัดแยกเบตา-เอคไดโซนจากเปลือกต้นไข่เน่าเพื่อทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

นำเปลือกต้นไข่เน่าที่อบแห้งและบดละเอียดแล้ว 600 กรัม มาสกัดแยกสารปนเปื้อนจำพวกไขมันออกโดยแช่ในเฮกเซน 2.5 ลิตร(แบ่งใส่ Erlenmeyer flask ขนาด 5 ลิตร 2 ใบ) เขย่าบน water bath อุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง กรองชั้นเฮกเซนออก และสกัดด้วยเฮกเซนซ้ำอีกครั้ง เปลือกแห้งที่ผ่านการสกัดด้วยเฮกเซนแล้วนำไปผึ่งให้แห้งแล้วจึงนำมาสกัดต่อด้วยเอธานอล (กลั่น 1 ครั้ง) 3 ลิตร วิธีการเช่นเดียวกับเฮกเซนแต่เพิ่มการสกัดเป็น 3 ครั้ง รวมชั้นเอธานอลจากการกรองทั้ง 3 ครั้ง ระเหยเอาตัวทำละลายส่วนใหญ่ออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน จนเหลือเอธานอลประมาณ 150 มล. เติมน้ำลงในสารสกัด 200 มล. และทำการสกัดสารเบตา-เอคไดโซนด้วยนอร์มอลบิวทานอล ครั้งละ 100 มล. ทำใน separatory funnel ขนาด 500 มล. รวม 5 ครั้ง นำชั้นนอร์มอลบิวทานอลมาระเหยเอาตัวทำละลายส่วนใหญ่ออก ด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน และนำไปอบต่อในตู้อบที่อุณหภูมิ 60°ซ จนแห้ง ชั่งหาน้ำหนัก นำสารสกัดที่แห้งแล้วละลายด้วยเมธานอล 15 มล. เติมซิลิกาเจล Art. 7729 คลุกผสมกับสารสกัดให้ทั่ว นำไปใส่ตอนบนคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5 ซม.ที่บรรจุด้วยซิลิกา Art. 7734 ปริมาณ 300 กรัมและปิดผิวหน้าด้วยแมกนีเซียมซัลเฟต สูงประมาณ 2 ซม. จากนั้นปิดทับชั้นสารสกัดด้วยแมกนีเซียมซัลเฟต ประมาณ 1 ซม. ชะผ่านด้วยคลอโรฟอร์ม 500 มล. คลอโรฟอร์ม-เมธานอล (95:5) 500 มล. คลอโรฟอร์ม-เมธานอล (90:10) 500 มล. และคลอโรฟอร์ม-เมธานอล(85:15) เก็บสารที่ผ่านคอลัมน์ไปตรวจสอบสารเบตา-เอคไดโซน เก็บส่วนที่มีสารไประเหยตัวทำละลายส่วนใหญ่ออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบหมุน นำสารละลายเข้มข้นเก็บในห้องเย็นเพื่อให้ตกผลึก ชั่งน้ำหนักผลึกที่ได้