บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

ในการทดลองนี้แบ่งออกเป็น 3 ตอน คือ

ตอนที่ 1 เพิ่มจำนวนต้นผักหวานบ้านพันธุ์เดิมกับผักหวานบ้านพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงโดยใช้สารโคลชิซิน

ตอนที่ 2 วิเคราะห์หาปริมาณของสารอาหารใน ใบ ลำต้น และราก ของผักหวานบ้านทั้งสองพันธุ์

ตอนที่ 3 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด

ตอนที่ 1 เพิ่มจำนวนต้นผักหวานบ้านพันธุ์เดิมกับผักหวานบ้านพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงโดยใช้สารโคลชิซิน

อุปกรณ์

1. **สารเคมี** ได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตรเอ็มเอส (Murashige and Skoog 1962) สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ บีเอ (6-benzyladenine) และ ไอเอเอ (indole-3-acetic acid) สารเคมีในการกำจัดสิ่งปนเปื้อน ได้แก่ แอลกอฮอล์ คลอรอกซ์ ทวีน 20 เบนเลท ผงซักฟอก
2. **เครื่องแก้ว** ได้แก่ ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชปากกว้างขนาด 4 ออนซ์ พร้อมฝาพลาสติกทนร้อน
3. **อุปกรณ์ในการผ่าตัด** ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ กรรไกรตัดกิ่งไม้
4. **ครุภัณฑ์** ได้แก่ หม้อนึ่งอัดไอ เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ตู้อบ เครื่องกลั่นน้ำแบบแก้ว แผ่นความร้อน เครื่องชั่งอย่างหยาบ เครื่องชั่งอย่างละเอียด จุดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ
5. **วัสดุเพาะปลูก** ได้แก่ หน้าดิน ขี้เถ้าแกลบ ปุ๋ยเคมี สูตร 15-15-15 ขุยมะพร้าว ถุงเพาะชำ
6. **ชิ้นส่วนพืช** ได้แก่ ผักหวานบ้านพันธุ์เดิม ผักหวานบ้านพันธุ์ที่ได้รับสารโคลชิซิน
7. **ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**

วิธีการทดลอง

1. **เตรียมชิ้นส่วนพืช** คัดเลือกตายอดและตาข้างของผักหวานบ้านพันธุ์เดิม และพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ มาทำความสะอาด โดยใช้ผงซักฟอกและล้างด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู ตัดกิ่งออกเป็นท่อนๆ แต่ละท่อนมีตาติดอยู่ 1 ตา

2. **เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ** เตรียมอาหารสูตรเอ็มเอส มี บีเอ และ ไอเอเอ 1.0 และ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ จำนวน 40 ขวด

3. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ** นำตายอดและตาข้างมาฟอกฆ่าเชื้อ โดยจุ่มในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 วินาที ย้ายมาฟอกในคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดแต่งเนื้อเยื่อ โดยใช้ตายอดและตาข้างวางเลี้ยงในอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

4. **นำต้นผักหวานบ้านมาเลี้ยงในสภาพแวดล้อมภายนอก** นำต้นผักหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้ง 2 พันธุ์ ออกจากขวดเพาะเลี้ยง โดยใช้ปากคีบดึงต้นออกจากขวดอย่างระมัดระวัง ไม่ให้รากขาด และต้นไม่ช้ำ หรือหัก ล้างวุ้นที่ติดมากับรากออกให้หมด นำมาเลี้ยงในวัสดุปลูก ประกอบด้วย ขี้เถ้าแกลบและดินร่วน ในอัตราส่วน 1;1 เป็นเวลา 1 เดือน ย้ายลงปลูกในดินร่วน ให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน

ต้นผักหวานที่ได้จากข้อ 4 นำมาวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารและฤทธิ์ของสารสกัดในตอนที่ 2

ตอนที่ 2 วิเคราะห์หาปริมาณของสารอาหารใน ใบ ลำต้น และราก ของผักหวานบ้านพันธุ์เดิมกับพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงโดยใช้สารโคลชิซิน ได้แก่

1. ความชื้น
2. ใยอาหาร
3. เถ้า
4. โปรตีน
5. เบต้า-แคโรทีน
6. กรดแอสคอร์บิค
7. ธาตุเหล็ก และ แคลเซียม
8. อัลคาลอยด์
9. ไกลโคไซด์

ข้อ 5, 6 และ 7 วิเคราะห์เฉพาะส่วนของใบและลำต้น

มีวิธีการดังนี้

2.1. ความชื้น

การหาความชื้นแบบ drying methods

อุปกรณ์

1. โถอบแห้งที่บรรจุ silica gel
2. จานอะลูมิเนียม
3. เตาอบ
4. คีมจับของร้อน
5. เครื่องชั่งชนิดจุดทศนิยม 3 ตำแหน่ง

วิธีวิเคราะห์หาความชื้น

1. นำตัวอย่างพืช ได้แก่ ใบ ลำต้น และราก ที่สะอาด มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ เท่าที่สามารถทำได้

2. เตรียมจานอะลูมิเนียมที่ล้างสะอาดแล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำออกจากเตาอบเข้าใส่ในโถอบแห้ง ทิ้งให้เย็นแล้วนำมาชั่งจนได้น้ำหนักที่แน่นอน

3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 3 กรัม ใส่ในจานอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน

4. นำจานอะลูมิเนียมไปอบในเตาอบแห้งที่อุณหภูมิ 80±0.5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำจานอะลูมิเนียมออกจากเตาอบแล้วทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง

5. เมื่อเย็นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก

6. นำจานอะลูมิเนียมกลับเข้าไปอบในเตาอบ ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 3-5 จนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ แสดงว่าน้ำได้ระเหยออกจากตัวอย่างไปหมดแล้ว

การคำนวณ

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{A-B}{W} x\, 100$$

A = น้ำหนักจานอะลูมิเนียม + ตัวอย่างก่อนเข้าอบ

B = น้ำหนักจานอะลูมิเนียม + ตัวอย่างหลังการอบ

W = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.2. ใยอาหาร

ใยอาหารที่หาในการวิจัยนี้เป็นชนิด neutral detergent fiber (ผนังเซลล์) จากน้ำหนักแห้ง

อุปกรณ์

1. เครื่องวิเคราะห์เส้นใย
2. เตาเผา
3. เตาอบ
4. เครื่องชั่งชนิด 3 ตำแหน่ง
5. ตะแกรงขนาด 20-30 mesh
6. เครื่องบดอาหาร
7. สารเคมี ได้แก่ decahydronapthalene (reagent grade), acetone, sodium sulphite (anhydrous reagent grade), สารละลาย neutral detergent

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่ตากแห้งและบดให้ได้ขนาดผ่านตะแกรง 1 มิลลิเมตร (20-30 mesh) 0.5 กรัม ใส่ลงใน Gooch crucible ที่แห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอน
2. นำ Gooch crucible วางลงบนเครื่องวิเคราะห์เส้นใย
2. เติมน้ำยาและสารเคมีตามลำดับดังนี้

น้ำยา neutral detergent เย็นประมาณ 22 องศาเซลเซียส	100 มิลลิลิตร
decahydronapthalene	2 มิลลิลิตร
sodium sulphite	0.5 มิลลิลิตร

3. ต้มให้เดือดภายใน 5-10 นาที เมื่อเริ่มเดือดลดความร้อนเพื่อกันไม่ให้ฟองล้นและปรับความร้อนเหลือเพียงพอให้เดือด แล้ว reflux นาน 60 นาที นับแต่เริ่มเดือด
4. กรองเอาสารละลายออก เหลือแต่เส้นใยอยู่ใน Gooch crucible
5. ล้างตัวอย่างส่วนที่ติดค้างอยู่บนภาชนะด้วยน้ำกลั่นร้อน 90-100 องศาเซลเซียส ใช้น้ำน้อยที่สุดเท่าที่จะใช้ได้ ทำการกรอง แล้วล้างด้วย acetone อีก 2 ครั้ง แล้วกรอง ทำให้เส้นใยแห้ง
6. อบ Gooch crucible ให้แห้งในเตาอบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำออกมาตั้งให้เย็นใน โถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักที่คงที่

7. คำนวณหาปริมาณ NDF (cell wall)

$$\% \text{ NDF} = \frac{A-B}{S} x\,100$$

เมื่อ A = น้ำหนัก crucible + NDF

B = น้ำหนัก crucible แห้ง

S = น้ำหนักตัวอย่างแห้ง

2.3. เถ้า

อุปกรณ์เช่นเดียวกับการหาใยอาหาร โดยดำเนินการต่อจากการวิเคราะห์ใยอาหารดังนี้ นำ crucible พร้อมตัวอย่างจากข้อ 2.2 ไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 500 –550 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หรือนานกว่านี้ จนตัวอย่างมีสีขาว แล้วชั่งน้ำหนัก Gooch crucible คำนวณหาปริมาณของเถ้าดังนี้

$$\% \text{ เถ้า} = \frac{C-B}{S} x\,100$$

เมื่อ C = น้ำหนัก crucible + ash

B = น้ำหนัก crucible แห้ง

S = น้ำหนักตัวอย่างแห้ง

2.4. โปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนดำเนินการดังนี้คือ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการย่อย
2. เครื่องกลั่น และไตเตรท ครบชุด
3. เครื่องชั่ง
4. Kjeldahl digestion flask ขนาด 800 มิลลิลิตร
5. ลูกแก้ว
6. สารเคมี ได้แก่

6.1 สารเร่งปฏิกิริยา ประกอบด้วย

โปแทสเซียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous K_2SO_4)

คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)

6.2 อินดิเกเตอร์

เตรียมโดย ละลาย เมทิลเรด 0.016 กรัม และ โบรโมเคซอลกรีน 0.83 กรัม ใน เอทธานอล 96 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร

6.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 45 เปอร์เซ็นต์

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 450 กรัม ด้วยน้ำกลั่นในบีกเกอร์ขนาดใหญ่ที่แช่อยู่ในอ่างน้ำเย็นเพื่อช่วยลดความร้อนที่เกิดขึ้นจากการละลาย ใช้แท่งแก้วคนช่วยในการละลาย เมื่อละลายหมดแล้วทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงเจือจางจนมีปริมาตร 1 ลิตร

7. Standard 0.1 *N* H_2SO_4

8. สารละลายกรดบอริค ละลายกรดบอริค 40 กรัม ในน้ำ แล้วเติมน้ำให้ได้ 1 ลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างให้มีน้ำหนัก 2 กรัม ใส่ใน Kjiedahl digestion flask

2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา โปแทสเซียมซัลเฟตแอนไฮดรัส 10 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต 0.5 กรัม และลูกแก้ว 2 เม็ด เพื่อป้องกันการกระเด็นอย่างแรง เทกรดกำมะถันเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ใส่ใน Kjiedahl digestion flask โดยค่อยๆ เทล้างคอขวดไปด้วย เขย่าอย่างระมัดระวัง จนกระทั่งผสมเข้ากันดี

3. เตรียม blank ด้วย โดยทำเช่นเดียวกัน แต่ไม่มีตัวอย่างพืช

4. วาง Kjiedahl digestion flask ในลักษณะเอนๆ บนเครื่องมือสำหรับย่อย ให้ความร้อน โดยเริ่มให้ร้อนน้อยๆ ก่อน จนเมื่อหยุดกระเด็นจึงให้ความร้อนให้เดือด ย่อยไปจนกระทั่งได้สารละลายที่ใส แล้วให้ความร้อนต่อไปอีก 1 ชั่วโมง เพื่อให้แน่ใจว่าการ oxidation นั้นสมบูรณ์

5. หยุดให้ความร้อนปล่อยให้เย็น ถ้าที่คอขวดมีจุดดำๆ ให้ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วให้ความร้อนต่อไปจนหมดควัน ทิ้งให้เย็น

6. นำสารละลายที่ย่อยได้มาถ่ายใส่เครื่องกลั่น ซึ่งติดตั้งไว้พร้อมแล้ว ให้ได้ปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยมีขวดแก้วก้นแบนขนาด 500 มิลลิลิตร บรรจุสารละลายกรดบอริค 50 มิลลิลิตร พร้อมอินดิเกเตอร์ 5-6 หยด บรรจุอยู่

7. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในขวดกลั่นจนมากเกินพอ ประมาณ 80 มิลลิลิตร ทำการกลั่นจนได้สิ่งกลั่นประมาณ 250-300 มิลลิลิตร

8. นำสิ่งกลั่นมาไตเตรท กับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริค จนได้ถึงจุดยุติอินดิเกเตอร์เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเทา ทำ blank อย่างเดียวกับตัวอย่าง ทุกขั้นตอน

9. การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน ร้อยละ} = \frac{1.4(V2 - V1)N}{W}$$

เมื่อ V1 คือ ปริมาตรเป็นมิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริคที่พอดีกับ blank

V2 คือ ปริมาตรเป็นมิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริคที่พอดีกับตัวอย่างที่กลั่นได้

W คือ น้ำหนักตัวอย่างเป็นกรัม

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟูริคเป็นนอร์มัล

ปริมาณโปรตีนร้อยละ = ปริมาณไนโตรเจน ร้อยละ x 6.25

2.5. เบต้า-แคโรทีน

เบต้า-แคโรทีน (β-carotene) โดยวิธี HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ HPLC
2. เครื่องหมุนเหวี่ยง
3. สารเคมี ที่ใช้เป็นชนิดบริสุทธิ์ และเป็นชนิดที่ใช้กับ HPLC ได้แก่
   - 3.1 pentane sulferic acid (PSA)
   - 3.2 tetramethyl ammonium chloride (TMA)
   - 3.3 acetonitrile
   - 3.4 methanal
   - 3.5 butyl hydroxyanisole (BHA)
   - 3.6 มาตรฐานวิตามินเอ เบต้า-แคโรทีน
   - 3.7 น้ำกลั่น

วิธีทำ

การเตรียมสารตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้ น้ำหนักที่แน่นอน 0.2 กรัม ใส่ในหลอดเซนตริฟิวก์ขนาด 15 มิลลิลิตร
2. หยด BHA 0.5 เปอร์เซ็นต์ 2-3 หยด

3. เติมกรดแอซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ จนมีปริมาตรครบ 5 มิลลิลิตร พ่นปากหลอดด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วปิดปากหลอด อุ่นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 2นาที แล้วทำให้เย็น

4. เติม isopropanal 1 มิลลิลิตร และเติมสาร เฮกเซน 6-8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้สักครู่ หรือนำเข้าเครื่องเหวี่ยง ชั้นเฮกเซนจะแยกออก

5. ดูดปริมาตรส่วนที่เป็นชั้นเฮกเซนไว้ แล้วนำส่วนที่ใสนี้ไปกรองผ่านเครื่องกรองแบคทีเรีย ที่มีขนาด 0.45 ไมครอน บรรจุส่วนที่กรองได้นี้ใส่ในขวดสีชา เก็บไว้ในที่เย็นระหว่างรอการตรวจสอบด้วย HPLC ซึ่งควรทำทันทีหลังจากเตรียมเสร็จ

6. นำสารที่สกัดได้มาตรวจสอบโดยใช้เครื่อง HPLC

2.6 กรดแอสคอร์บิค

การตรวจสอบกรดแอสคอร์บิค ใช้เครื่อง HPLC มีวิธีการดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างที่จะตรวจสอบให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 0.2 กรัม ใส่ในหลอดเซนตริฟิวก์ขนาด 15 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลายที่ใช้ในการสกัด ได้แก่กรดแอซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมี 0.01 *M.* PSA 0.005 *M.* TMA จนมีปริมาตรเกือบถึง 10 มิลลิลิตร

3. อุ่นที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายที่ใช้ในการสกัด เขย่าให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยง

4. แยกส่วนที่ใสไปกรอง ผ่านเครื่องกรองแบคทีเรีย ที่มีขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำส่วนที่กรองได้ไปใส่ขวดสีชา เก็บไว้ในที่เย็นระหว่างรอการตรวจ HPLC

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายวิตามินมาตรฐานชนิดละลายน้ำ ชั่งสารวิตามินมาตรฐานแต่ละชนิดในปริมาณที่แน่นอน 1-3 มิลลิกรัม ละลายใน 1 เปอร์เซ็นต์ กรดแอซิติก 10 มิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐาน ชนิดละลายไขมัน ชั่งสารวิตามินมาตรฐานแต่ละชนิดในปริมาณที่แน่นอน 1-3 มิลลิกรัม ละลายใน เมทิลแอลกอฮอล์ ; เฮกเซล = (30;70) จำนวน 10 มิลลิลิตร

นำสารที่สกัดได้ไปวิเคราะห์โดยใช้ HPLC

2.7 เหล็กและแคลเซียม

การวิเคราะห์เหล็กและแคลเซียมมีหลักการดังนี้

1. นำตัวอย่างพืชที่แห้งมาชั่งน้ำหนัก
2. นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เพื่อให้น้ำระเหย
3. เผาโดยใช้ตะเกียงบุนเซน (Bunsen) อุณหภูมิไม่เกิน 700 องศาเซลเซียส
4. เผาให้สมบูรณ์โดยใช้เตาเผาอุณหภูมิ 900 องศาเซลเซียส จนเป็นเถ้าสีขาว ชั่งและจดน้ำหนัก
5. ทำการย่อย โดยใช้บีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และกรดเกลือเข้มข้น ปิดปากบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา วางบนแผ่นความร้อน อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อครบ 15 นาที แล้วเทเบ้าลงในบีกเกอร์ ย่อยต่อ 45 นาที ล้างเบ้าให้สะอาด สารละลายที่ได้มาให้ดูว่ามีตะกอนหรือไม่ ถ้ามีตะกอนต้องกรองสารละลาย แต่ไม่เอาตะกอน การกรองใช้กระดาษกรอง
6. นำสารละลายที่ได้มา ปรับให้มีปริมาตร 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ทำเป็น stock solution
7. แบ่ง stock solution ออกเป็น 2 ชุด สำหรับวิเคราะห์เหล็ก โดยใช้ AAS และวิเคราะห์แคลเซียม

2.8 ทดสอบหาสารอัลคาลอยด์ โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี

นำส่วนสกัดมา 25 มิลลิลิตร ระเหยให้แห้ง นำสารสกัดที่ได้มาละลายใน 5 เปอร์เซ็นต์ hydrochloric acid 20 มิลลิลิตร กรองเอาสารละลายมาแบ่งเป็น 5 หลอด แล้วทดสอบดังนี้

หลอดที่ 1 ใช้เป็นชุดควบคุม

หลอดที่ 2 เติม Wagner' s reagent ผล + จะได้ตะกอนสีน้ำตาล

หลอดที่ 3 เติม Marme's reagent ผล + จะได้ตะกอนสีขาว

หลอดที่ 4 เติม Mayer's reagent ผล + จะได้ตะกอนสีขาว-ครีม

หลอดที่ 5 เติม Dragendorff's reagent ผล + จะได้ตะกอนสีส้ม

2.9 ทดสอบหาสารไกลโคไซด์

ได้แก่

1. Screening for flavonoids (Shioda test)

มีวิธีการดังนี้

1.1 นำส่วนสกัดมา 20 มิลลิลิตร ระเหยให้แห้งบนเครื่องอังน้ำ จากนั้นทำให้เย็น ทำการล้างไขมัน และ สี ของส่วนสกัดด้วย petroleum ether หลายๆครั้ง รินออกจนกระทั่ง petroleum ether ไม่มีสี (รวมสารละลายในชั้น petroleum ether ระเหยแห้ง เก็บไว้ตรวจสอบ sterols และ triterpenes)

1.2 สกัดกากจากข้อ 1.1 ที่ล้างไขมันและสีออกไปแล้วด้วย 50 เปอร์เซ็นต์เอทธานอล 10 มิลลิลิตร กรอง แบ่งเป็น 2 ส่วน เป็นชุดควบคุม 1 ส่วน ชุดทดสอบ 1 ส่วน ทดสอบสารกลุ่ม flavonoids โดยการนำส่วนสกัดมาเติม magnesium ribbon ชิ้นเล็กๆ ลงไป 2-3 ชิ้น ขนาดยาว 2-3 มิลลิเมตร แล้วหยด hydrochloric acid เข้มข้นลงไป 3-4 หยด ดูสีที่เกิดขึ้นภายใน 1-2 นาที ผล positive จะได้สีแดง ส้ม เลือดหมู-ม่วง เขียว หรือ น้ำเงิน

2. Screening for anthraquinones (Borntrager's test)

2.1 นำส่วนสกัดมา 20 มิลลิลิตร ระเหยให้แห้ง เติม sulfuric acid 10 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด เป็นเวลา 5 นาที กรองสารละลายออกมาทิ้งไว้ให้เย็น

2.2 นำสารละลายที่ได้มาสกัดกับ benzene 5 มิลลิลิตร โดยเขย่าเบาๆ แยกชั้น benzene ออกมา

2.3 นำสารละลายในชั้น benzene มาเติม10 เปอร์เซ็นต์ sodium hydroxide 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วปล่อยให้แยกชั้น สังเกตสีที่เกิดขึ้นในชั้นต่าง ผล + ในชั้นต่างจะมีสีชมพูถึงแดง

3. Screening for sterols และ triterpenes

3.1 ใช้สารสกัดในชั้น petroleum ether ในข้อ 1.1 มาละลายใน chloroform 15 มิลลิลิตร แบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยใช้เป็นชุดควบคุม 1 ส่วน

3.2 Liebermann-Burchard test

นำส่วนที่ 1 มาระเหยแห้งเติม acetic anhydride 3 หยดในถ้วยกระเบื้องคนให้ละลายเข้ากัน เติม sulfuric acid เข้มข้นจำนวน 3 หยด สังเกตสีทันที (เทียบกับสีเดิม) ถ้ามี

กลุ่มสารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น sterols จะให้สีน้ำเงินถึงสีเขียว แต่ถ้ามีกลุ่มสารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น triterpenes จะให้สีแดงชมพูถึงสีม่วงแดง

4. Screening for saponin glycosides

นำส่วนสกัดมา 30 มิลลิลิตร ระเหยให้แห้ง เติมน้ำร้อน 20 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน อุ่นบนเครื่องอังน้ำร้อน 1-2 นาที กรองนำสารละลายมาทดสอบ

4.1 การทดสอบการเกิดฟอง (froth tes)

นำส่วนสกัด 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร ปิดจุกหลอด แล้วเขย่าโดยแรงเป็นเวลาประมาณ 30 นาที สังเกตลักษณะของฟองที่เกิดขึ้นและเวลาที่ฟองยังคงอยู่ ถ้ามี saponin glycosides จะเกิดฟองที่คงตัวอยู่นานกว่า 30 นาที และฟองมีลักษณะคล้ายรังผึ้ง

4.2 Liebermann –Burchard test

นำส่วนสกัดมา 3 มิลลิลิตร ใส่ในถ้วยกระเบื้อง ระเหยบนอ่างน้ำร้อนให้แห้ง ทำให้เย็น เติม petroleum ether เพื่อละลายสีที่ติดมาออก แล้วเอาคราบที่เหลือ (residue) มาละลายใน chloroform นำมากรองแบ่งเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 เป็นชุดควบคุม

ส่วนที่ 2 เติม acetic anhydride 3 หยด ผสมให้เข้ากันแล้วเติม sulfuric acid เข้มข้น 3 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้น ถ้ามี aglycone ที่มีสูตรโครงสร้างเป็น steroid saponin จะให้สีน้ำเงินถึงสีเขียว ถ้า aglycone เป็น triterpenoid saponin จะให้สีแดง ชมพูถึงสีม่วงแดง

5. Screening for cardiac glycosides

ประกอบด้วย 3 การทดสอบ เพื่อตรวจหา unsaturated lactone ring, steroidal nucleus และ deoxy sugar

5.1 การตรวจสอบ unsaturated lactone ring ทดสอบโดยใช้ Kedde' s reagent โดยแบ่งส่วนสกัดมา 2-3 หยด ใส่ในถ้วยกระเบื้อง เติม Kedde' s reagent 1-2 หยด ผสมให้เข้ากัน และเติมสารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ ของ potassium hydroxide ในแอลกอฮอล์ 1-2 หยด ผล + จะเกิดสีม่วงแดง ทันที เมื่อทิ้งไว้สักครู่สีจะซีดหายไป และทดสอบโดยใช้ Raymond's reagent โดยแบ่งส่วนสกัดมา 2-3 หยด ใส่ในถ้วยกระเบื้อง เติม Raymond's reagent 1-2 หยด และเติมสารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ ของ potassium hydroxide ในแอลกอฮอล์ 1-2 หยด ผล + จะเกิดสีม่วงน้ำเงิน ทันที เมื่อทิ้งไว้สักครู่สีก็จะซีดหายไป

5.2 การตรวจสอบ steroidal nucleus โดยการทำ Liebermann-Burchard test ทดสอบโดยการแบ่งส่วนสกัดมา 3 มิลลิลิตร ระเหยให้แห้ง ทำการทดสอบเหมือนการทดสอบสารกลุ่ม saponin สังเกตสีที่เกิดขึ้น ถ้ามี aglycone ซึ่งมีสูตรโครงสร้างเป็น steroid จะให้สีน้ำเงินถึงสีเขียว

5.3 การตรวจสอบ deoxy sugar โดยการทำ Keller-Kiliani test โดยการแบ่งส่วนสกัดที่ต้องการทดสอบมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม glacial acetic acid เข้มข้น 1 มิลลิลิตร และสารละลาย ferric chloride 10 เปอร์เซ็นต์ 1-2 หยด ผสมให้เข้ากัน เอียงหลอดทดลอง ค่อยๆ ริน sulfuric acid เข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปตามผนังด้านในของหลอดทดลอง ให้เกิดการแยกชั้น สังเกตสีตรงรอยต่อ ผล + ตรงรอยต่อของสารละลายจะได้วงแหวนสีน้ำตาลแดง

6. Screening for tannins และ phenolic compounds

นำส่วนสกัด 100 มิลลิลิตร มาระเหยให้แห้ง เติมน้ำกลั่นร้อน 25 มิลลิลิตร ลงไปละลายทิ้งให้เย็น กรอง จากนั้นนำส่วนสารละลายมาเติม sodium chloride 10 เปอร์เซ็นต์ 3-4 หยด ถ้ามีตะกอนเกิดขึ้นให้กรองออก (เป็น non – tannin components) แบ่งสารละลายเป็น 4 หลอด

หลอดที่ 1 เป็นชุดควบคุม

หลอดที่ 2 เติม gelatin solution 1 เปอร์เซ็นต์ สังเกตการเกิดตะกอน ผล + จะได้ตะกอนสีขาวขุ่น

หลอดที่ 3 เติม ferric chloride 1 เปอร์เซ็นต์ 2-3 หยด สังเกตสีที่ได้ ผล + จะได้สีเขียวดำ หรือ น้ำเงินดำ

หลอดที่ 4 เติมน้ำยาอิ่มตัวของ bromine ในน้ำ 2-3 หยด สังเกตการเกิดตะกอน ผล + จะได้ตะกอนเบามีสีขาวอมเหลือง

การประเมินผล

1. ถ้าไม่เกิดสีกับ ferric chloride 1 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าไม่มี tannins และ phenolic compounds

2. ถ้าได้สีเขียวดำ เมื่อเติม ferric chloride1 เปอร์เซ็นต์ และ ให้ตะกอน ตะกอนเบามีสีขาวอมเหลืองกับน้ำยาอิ่มตัวของ bromine ในน้ำ แสดงว่ามี tannins ชนิด catechol

3. ถ้าได้สีน้ำเงินดำ เมื่อเติม ferric chloride 1 เปอร์เซ็นต์ และไม่ให้ตะกอนกับน้ำยาอิ่มตัวของ bromine ในน้ำ แสดงว่ามี tannins ชนิด pyrogallol

4. ถ้าไม่เกิดตะกอนกับ gelatin solution 1 เปอร์เซ็นต์ แต่เกิดสีกับ ferric chloride 1 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าไม่มี tannins แต่มี phenolic compounds

7. Screening for lactone glycosides (coumarin glycosides)

7.1 นำสารสกัดมาประมาณ 0.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นเล็กน้อยเพื่อให้ชื้น

7.2 ปิดหลอดทดลองด้วยจุกคอร์ก ซึ่งมีที่แขวนกระดาษกรองชุบสารละลาย sodium hydroxide 10 เปอร์เซ็นต์ ไว้พอหมาดๆ แขวนอยู่

7.3 นำหลอดทดลองมาแช่ในอ่างน้ำเดือด ประมาณ 15 นาที

7.4 เปิดจุกคอร์ก นำแถบกระดาษกรองที่แขวนไว้มาวางบนกระจกนาฬิกา นำไปวางภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร สังเกตสีบนแถบกระดาษกรองถ้ามี coumarins ชนิดที่ระเหยได้ ผลที่ได้จะเห็นแถบกระดาษกรอง เรืองแสงสีเขียวอมเหลืองหรือสีฟ้า (ถ้าเรืองแสงสีฟ้า จะเกิดขึ้นทันทีที่วางในแสงอัลตราไวโอเลต)

8. Screening for iridoid glycosides

8.1 นำสารสกัดมา 0.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติม sulfuric acid 2 เปอร์เซ็นต์ ลงไปให้ท่วม

8.2 เขย่า รินสารละลายมา 1 มิลลิลิตร เติม iridoid's reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 1 นาที ผล + จะเกิดสีเขียวถึงน้ำเงินหรือมีตะกอนดำเกิดขึ้น

9. Screening for carbohydrates

โดยวิธี Molisch's test

9.1 นำสารสกัดละลายน้ำหรือแอลกอฮอล์เจือจางมาเติม 5 เปอร์เซ็นต์ alpha-naphthol ในแอลกอฮอล์ เขย่าให้เข้ากัน

9.2 ค่อยๆ รินกรดกำมะถันเข้มข้นลงข้างๆ หลอดให้แยกเป็น 2 ชั้น

9.3 ถ้า + จะมีวงแหวนสีม่วงแดงตรงรอยต่อ

Fehling's test

นำสารละลายในน้ำหรือแอลกอฮอล์เจือจาง มาทำให้เป็นด่าง แล้วเติม Fehling's reagent (A และ B) นำไปต้มให้เดือด ถ้ามี reducing compound จะมีตะกอนสีแดงอิฐเกิดขึ้น

10. Test for proteins (Ninhydrin test)

10.1 นำสารละลายในน้ำหรือในแอลกอฮอล์เจือจาง 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย HCl 3-4 หยด แล้วนำไปต้มในเครื่องอังน้ำ สักครู่

10.2 ทำให้เป็นด่าง และเติมน้ำยา ninhydrin 2-3 หยด นำไปต้มต่อ ถ้าเป็น + จะได้สีม่วง ซึ่งละลายใน amyl alcohol

ตอนที่ 3 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด มีการทดสอบดังนี้

3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Radical Scarvenging Assay

หลักการ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) เป็นอนุมูลอิสระ (free radical) เมื่ออยู่ในรูปของสารละลายใน ethanol จะมีสีม่วง ซึ่งสามารถวิเคราะห์ปริมาณได้โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และเมื่อ DPPH รับ electron หรือ hydrogen radical จะทำให้สีจางลง แสดงว่าสารนั้นมี antioxidative effect โดยกลไกของการต้านอนุมูลอิสระ มีวิธีการทดสอบดังนี้

1. การเตรียมสารละลายของ DPPH ใน ethanol

เตรียม DPPH ให้มีความเข้มข้น 6x 10^{5} *M* จำนวน 150 มิลลิลิตร โดยชั่งน้ำหนัก DPPH 3.6 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 150 มิลลิลิตร ด้วย absolute ethanol เก็บไว้ในขวดสีชา น้ำหนักโมเลกุล DPPH = 394.32 สูตรเคมี $C_{18}H_{12}N_5O_6$

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานที่ใช้คือ BHT (butylhydroxytoluene) เตรียมให้มีความเข้มข้น 100 50 25 และ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ความเข้มข้นหลังสุด คือ 50 25 12.5 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 5 มิลลิลิตร โดยใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย

3. การเตรียมสารตัวอย่าง

สารละลายที่ใช้คือ crude extract เตรียมสารละลายของตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 200 100 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 มิลลิลิตร โดยใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย

4. การทดสอบ

สารละลายตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

↓

เติมสารละลายของ DPPH ใน absolute ethanol 500 ไมโครลิตร

↓

ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm

โดยใช้สารตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร ผสมกับ absolute ethanol 500 ไมโครลิตร เป็น blank

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานและชุดควบคุมที่ 520 nm

โดยที่ประกอบด้วย ethanol 500ไมโครลิตร

และใช้ absolute ethanol 1000 ไมโครลิตร เป็น blank

การคำนวณ

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{OD contron} - \text{OD sample}}{\text{OD contron}} \times 100$$

แล้วนำค่ามาเขียนกราฟ ระหว่างความเข้มข้น (X) และเปอร์เซ็นต์ Inhibition (Y) อ่านค่าที่ได้

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity test)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดในชั้นethanolโดยวิธี disc diffusion test

1. หลักการ ใส่สารสกัดลงในแผ่น disc แล้ววางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจุลินทรีย์ ถ้าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้จะเกิด inhibition zone รอบๆแผ่น disc

2. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียม Mueller Hinton agar (MHA) สำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย subouraud dextrose agar (SDA) สำหรับเลี้ยงยีสต์

3. เตรียม Mcfantand standard No 0.5

เตรียมโดยใช้ $BaCl_2.2H_2O$ 0.048 *M* จำนวน 0.05 มิลลิลิตร รวมกับกรด H_2SO_4 0.36 *N* (1 เปอร์เซ็นต์ V/V) 9.35 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีความขุ่นเท่ากับเชื้อแบคทีเรีย 1.5x 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ใส่ในหลอดฝาเกลียว ก่อนใช้เทียบความขุ่นกับเชื้อโดยเขย่า $BaSO_4$ standard

ด้วยเครื่องเขย่าก่อน การเทียบความขุ่นให้ใช้แผ่นกระดาษขาวขีดเส้นสีดำเทียบ โดยดูเส้นสีดำที่อยู่ด้านหลังของหลอดที่มีเชื้ออยู่ ให้มีสีเข้มเท่ากับเส้นสีดำที่อยู่ด้านหลังของหลอดที่มี $BaSO_4$ standard

4. การเตรียมแผ่น disc

4.1 Sample disc เตรียมสารละลายที่ต้องการทดสอบให้มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับสารสกัดที่เตรียมด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ให้ละลายด้วย dimethylsulfoxide (DMSO) หรือ absolute ethanol ส่วนสารสกัดที่เป็นชั้นน้ำ ให้ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย จากนั้นดูดสารละลายที่เตรียมไว้ 10 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่น disc ไร้เชื้อที่วางอยู่บนตะแกรง ดังนั้นจะมีปริมาณของสารสกัดบนแผ่น disc เท่ากับ 10 มิลลิกรัม

4.2 Control disc ใช้ตัวทำละลายแทนสารสกัด ได้แก่แอลกอฮอล์

4.3 Positive control disc ใช้ยามาตรฐานแทนสารสกัด ได้แก่ยา

4.4 การเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ เชื้อที่ใช้ได้แก่ *Staphylococcus aureus Bacillus subtilis Proteus vulgalis Pseudomonas aeruginosa*

วิธีการเตรียมเชื้อ โดยเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เลี้ยงยีสต์บนอาหารนาน 24- 48 ชั่วโมง ใช้ลูป เขี่ยเชื้อมา 2-3 colony ใส่ใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl sterile และปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ Mcfanland standard No .0.5

5. วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

ใช้ไม้พันสำลีไร้เชื้อจุ่มแบคทีเรียและยีสต์
ที่ปรับความขุ่นของเชื้อแล้ว

↓

Streak จนทั่วจานเพาะเลี้ยง

↓

วางแผ่น disc ลงบนจาน โดยแต่ละแผ่นห่างกัน 15-20 มิลลิเมตร

↓

กลับด้านของจาน บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
แบคทีเรียบ่มนาน 18 ชั่วโมง
ยีสต์บ่มนาน 24 ชั่วโมง

↓

อ่านผลโดยสังเกต inhibition zone
วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสด้วย vernier caliper

3.3 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็ม

1. หลักการ การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็ม (brine shrimp) เป็นการทดสอบทางชีวภาพแบบไม่จำเพาะเจาะจง อาศัยหลักการว่าสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางเภสัชใดๆ ก็ตามเมื่อเพิ่มขนาดการให้ยาจนถึงระดับหนึ่งแล้ว จะแสดงความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตได้

2. ขั้นตอนการทดสอบ

2.1. การเตรียมตัวอย่างไรน้ำเค็ม เพาะไรน้ำเค็มในน้ำทะเลเทียมโดยใช้น้ำเค็มประมาณ 200 มิลลิลิตร ไรน้ำที่ใช้ในการทดสอบควรมีอายุประมาณ 48 ชั่วโมง ภาชนะที่ใช้ในการเพาะไข่ไรน้ำเค็มเป็นภาชนะก้นตื้น ภายในมีผนังแบ่งเป็น 2 ตอน ที่ผนังมีรู ที่ไรน้ำเค็มสามารถลอดผ่านไปได้ แนวที่เจาะรูจะต้องอยู่ต่ำกว่าระดับน้ำทะเลที่จะเติมลงไปเพื่อเลี้ยงไรน้ำเค็ม โปรยไข่ไรน้ำเค็มลงในภาชนะตอนที่ 1 แล้วปิดภาชนะส่วนนี้ให้มืด ฉายไฟเหนือภาชนะส่วนที่ไม่มีไข่ไรน้ำเค็ม ตัวอ่อนไรน้ำเค็มหลังฟักออกจากไข่จะว่ายน้ำผ่านช่องที่เจาะไป ยังด้านที่มีแสงสว่าง ถ่ายตัวอย่างไรน้ำเค็มลงในบีกเกอร์ ให้มีปริมาณที่พอเหมาะ อาจเติมน้ำทะเลเพิ่มได้ถ้าตัวอย่างมีความหนาแน่นมากเกินไป เติม yeast suspension ประมาณ 3-4 หยด เพื่อใช้เป็นอาหารของไรน้ำเค็ม

2.2. การเตรียมตัวอย่างทดสอบ ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบเป็นตัวอย่างที่ละลายอยู่ในน้ำทะเลเทียมที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน 3 ระดับความเข้มข้น การสกัดหยาบทดสอบที่ความเข้มข้น 1,000 100 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของน้ำทะเล ในกรณีที่สารละลายตัวอย่างไม่ละลายในน้ำทะเล ให้ใช้ dimethyl sulfoxide เป็นตัวทำละลายช่วย โดยความเข้มข้นของ dimethyl sulfoxide จะต้องไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ การเตรียมสารละลายตัวอย่างเพื่อทดสอบให้เตรียมความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นสุดท้าย เช่น 2,000 200 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.3. การเพาะเลี้ยงไรน้ำเค็มในสารละลายตัวอย่างในการทดสอบนี้เป็นการทดสอบใน microwell plates โดยนับตัวอย่างไรน้ำเค็มลงใน microwell plates ปริมาณสัตว์ทดลอง 10-15 ตัวในน้ำทะเล 0.1 มิลลิลิตร เตรียมสัตว์ทดลอง 3 ชุด ต่อสารละลายตัวอย่าง 1 ความเข้มข้น หลังจากนับไรน้ำเค็มลงใน microwell plates ครบตามที่ต้องการ เติมสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลุม ดังนั้นปริมาตรสุดท้ายขณะทดลองคือ 0.2 มิลลิลิตร เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อาจมีแสงไฟส่องเพื่อกระตุ้นสัตว์ทดลอง

2.4. การตรวจนับสัตว์ทดลองและการรายงานผล หลังจากเลี้ยงไว้ 24 ชั่วโมง หรือน้อยกว่านั้นถ้าสารมีฤทธิ์ นำสัตว์มาตรวจนับจำนวนสัตว์ที่ตาย โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ สัตว์ที่ตายจะอยู่ก้นหลุม ไม่เคลื่อนไหวและนับสัตว์ทดลองทั้งหมด โดยฆ่าสัตว์ทดลองด้วย สารละลายฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 3-4 หยด ประมาณ 4-5 นาที ก่อนที่สัตว์ทดลองจะตายทั้งหมด