บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือและสารที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 เครื่องมือ

จุดหลอมเหลวของสารวัดด้วย Electrothermal Melting Point Apparatus

Ultraviolet (UV) Spectra บันทึกด้วยเครื่อง JASCO

Infrared (IR) Spectra บันทึกด้วยเครื่อง JASCO IR 810 และ JASCO A 200

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectra บันทึดด้วยเครื่อง Bruker WM - 400

Mass Spectra บันทึกด้วยเครื่อง A.E.I.M.S. 30

2.1.2 โครมาโตกราฟี (Chromatography)

คอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบรวดเร็ว (Quick Column Chromatography) ใช้ซิลิกาเจล (Silicagel) 60 G. Merck เป็นตัวดูดซับ, โครมาโตรกราฟีแผ่นบาง(Thin Layer Chromatography) และโครมาโตกราฟีแผ่นหนา (Preparative Thin Layer Chromatography) ใช้ซิลิกาเจล (Silicagel) 60 GF 254 Merck เป็นตัวดูดซับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.3 ตัวทำละลาย

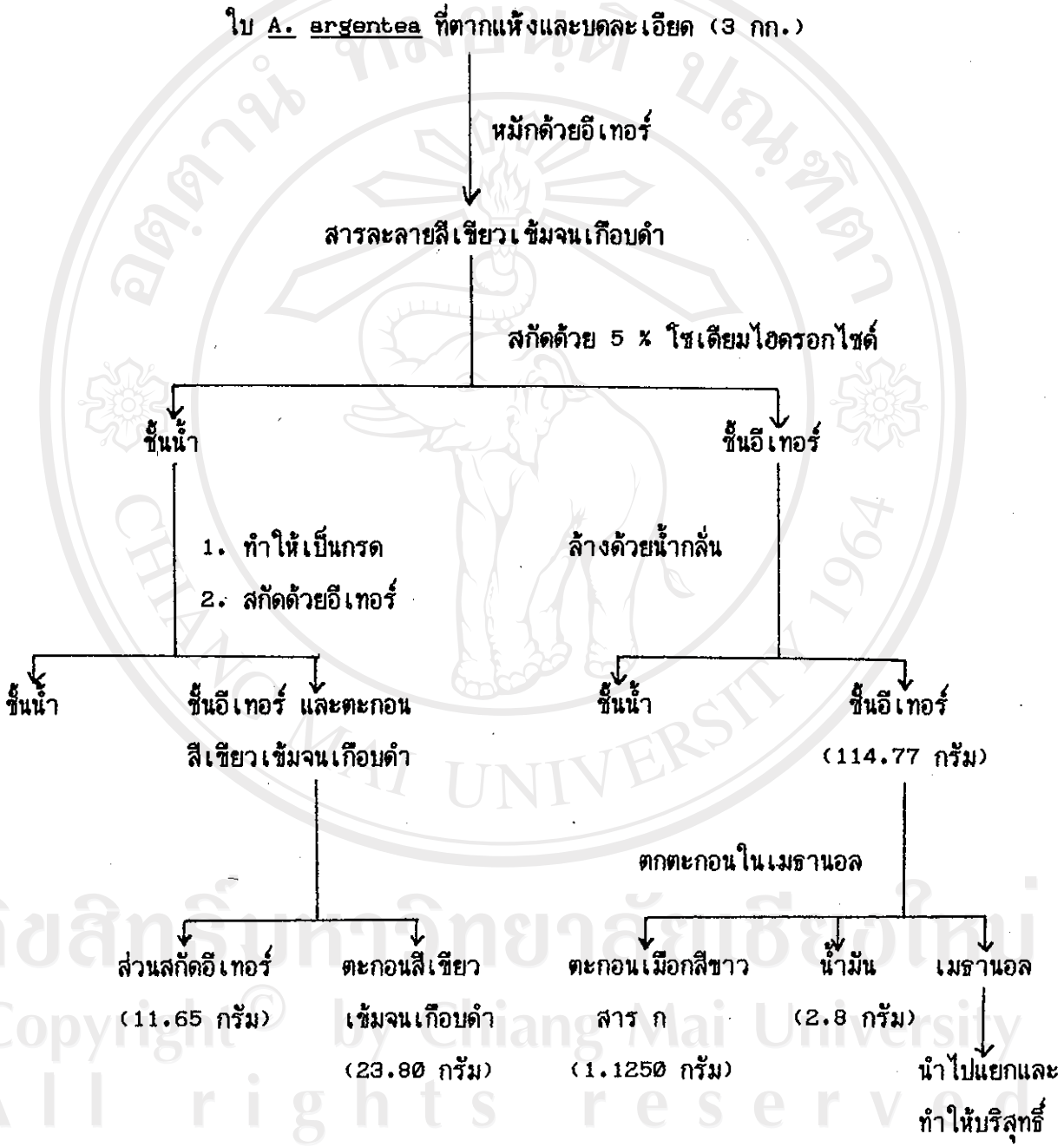
ตัวทำละลายที่ใช้ ได้แก่ อะซีโตน, เบนซิน, ไดคลอโรมีเทน, อีเทอร์, เฮกเซน และเมธานอล ทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่น

2.1.4 พืชที่ใช้ในการทดลอง

พืชที่ใช้ในการทดลองได้ผ่านการตรวจเอกลักษณ์จาก J.F. Maxwell แล้ว คือ ต้น Algaia argentea Bl.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แผนภาพที่ 1 แสดงวิธีการสกัดสารจากใบ A. argentea Bl.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 วิธีทดลอง

2.2.1 การสกัด

หมักใบ A. argentea Bl. ที่ตากแห้งและบดละเอียด (3 กก.) ด้วยอีเทอร์ (14 ลิตร) นาน 1 วัน, 3 ครั้ง, กรองได้สารละลายสีเขียวเข้มจนเกือบดำ นำไประเหยลดปริมาตรภายใต้ความดันต่ำ จนปริมาตรเหลือ 1 ลิตร นำไปสกัดกับ 5 % โซเดียมไฮดรอกไซด์ (1 ลิตร) 3 ครั้ง แยกได้ 2 ส่วน คือ

2.2.1.1 Phenolic Part คือ ชั้นน้ำ กรอง นำสารละลายที่ได้ทำให้เป็นกรด สกัดกับอีเทอร์ (1 ลิตร) 2 ครั้ง ชั้นอีเทอร์มีตะกอนสีเขียวเข้มจนเกือบดำ แยกชั้นอีเทอร์และตะกอนออกจากกัน ระเหยชั้นอีเทอร์ให้แห้งภายใต้ความดันต่ำได้สารสีเขียว (11.65 กรัม) ส่วนตะกอนมีสีเขียวเข้มจนเกือบดำ (23.80 กรัม)

2.2.1.2 Nonphenolic Part คือ ชั้นอีเทอร์ ล้างด้วยน้ำกลั่น ชั้นอีเทอร์มีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น เติมอีเทอร์ลงไปละลายตะกอน และระเหยภายใต้ความดันต่ำจนแห้ง ได้สารสีเขียวเข้ม (114.77 กรัม) นำไปตกตะกอนโดยเทลงในเมธานอลที่ร้อนและคนอยู่ตลอดเวลา เกิดตะกอนเมือก (Gel) สีขาว กรอง ได้ตะกอนเบาสีขาวของสาร ก (1.1250 กรัม, 0.04 % เมื่อเทียบกับน้ำหนักใบแห้ง) ชั้นเมธานอลแช่เย็นได้น้ำมันแยกออกมา (2.8 กรัม) ชั้นเมธานอลนำไปแยกและทำให้บริสุทธิ์

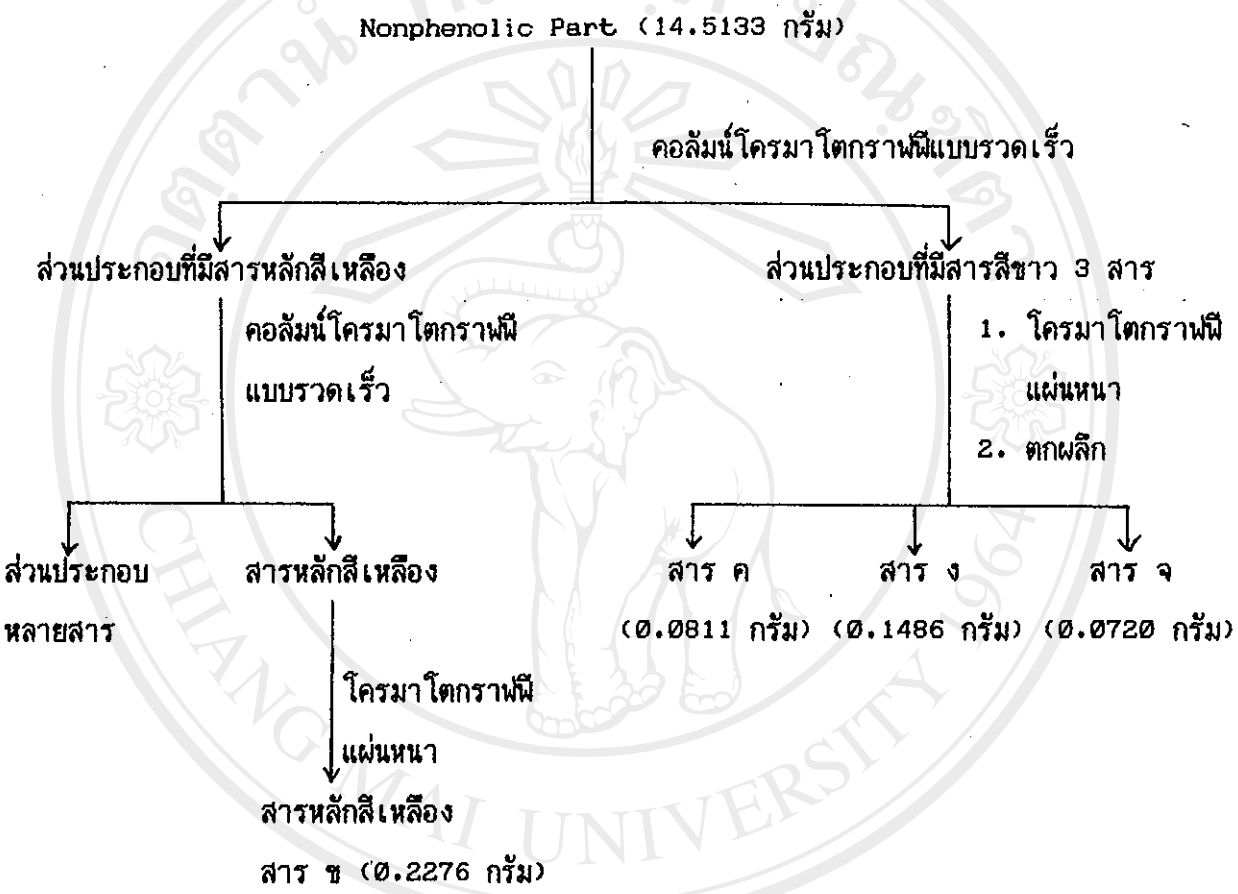
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 ผลการสกัดสารจากใบ A. argentea Bl.

รายละเอียด	ผลการสกัด
% Crude Yield	7.64
% Phenolic Part	0.49
% Nonphenolic Part	4.15

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แผนภาพที่ 2 แสดงการแยกสารและทำให้บริสุทธิ์ของ Nonphenolic Part



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2 การแยกสารและทำให้บริสุทธิ์

นำ Nonphenolic Part (14.5133 กรัม) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีแบบรวดเร็วใช้ซิลิกาเจล 60 G. เป็นตัวดูดซับและชะคอลัมน์ด้วยไดคลอโรมีเทน, เมธานอล-ไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ ระเหยตัวทำละลายออกพอสมควร ตรวจดูส่วนที่ชะได้ด้วยโครมาโตกราฟฟีแผ่นบาง รวมส่วนที่คล้ายกันเข้าด้วยกันได้ส่วนต่าง ๆ ดังนี้

ส่วนที่ 1 มีสารประกอบหลักสีเหลือง 1 สาร (สาร ข)

ส่วนที่ 2 มีสารที่น่าสนใจสีขาว 3 สาร (สาร ค., สาร ง. และ สาร จ.)

2.2.2.1 การแยกสาร ข

นำส่วนที่ 1 ไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีแบบรวดเร็วอีกครั้ง ทำการชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน ตามลำดับ ระเหยตัวทำละลายออกพอสมควร ตรวจดูส่วนที่ชะด้วยโครมาโตกราฟฟีแผ่นบาง รวมส่วนที่คล้ายกันเข้าด้วยกัน ได้ส่วนต่าง ๆ ดังนี้

ส่วนที่ 3 มีสารประกอบหลายสาร

ส่วนที่ 4 มีสารหลักสีเหลือง

นำส่วนที่ 4 ไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟฟีแผ่นหนา โดยใช้ซิลิกาเจล 60 GF 254 เป็นตัวดูดซับหนา 1.0 ม.ม. น้ำยาพา (Developing Solvent) ที่ใช้คือ 5 % อะซีโตนในเฮกเซน แยกได้สาร ข เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง (0.2276 กรัม, 0.06 % เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักใบแห้ง)

2.2.2.2 การแยกสาร ค., สาร ง. และ สาร จ.

นำส่วนที่ 2 แยกต่อโดยใช้โครมาโตกราฟฟีแผ่นหนา น้ำยาพาที่ใช้คือ อีเทอร์ แยกได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ก. สาร ค. ทำให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนในไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน ได้ตะกอนสีขาว (0.0811 กรัม, 0.02 % เมื่อเทียบกับน้ำหนักใบแห้ง) ตกผลึกซ้ำใหม่ในเบนซินได้ผลึกรูปเข็ม

UV $\lambda^{Ethanol}_{Max}$ nm (log ϵ) : 283 (4.26)

IR ν^{KBr}_{Max} cm^{-1} : 3250, 3030, 1675, 1645, 1600, 1525, 1520, 1500, 1320, 1265, 765, 680

400 MHz ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ ppm : 7.71 (1H,d), 7.68(1H,d), 7.52(2H,m), 7.34(3H,m), 6.97(1H,d), 6.92(1H,d), 6.53(1H,d), 6.15(1H,t), 3.60(2H,ABq), 2.25(1H,m), 2.00(2H,ABq), 1.95(2H,m), 1.55(2H,ABq), 1.18(3H,d), 1.06(3H,d), 0.9(3H,t), 0.8(3H,t)

MS m/e (relative intensity) : 300 (10), 215(27), 199(58), 169(63), 131(100), 103(88), 85(96)

ข. สาร ง. ทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนในไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน ได้ตะกอนสีขาว (0.1486 กรัม, 0.04 % เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักใบแห้ง) ตกผลึกซ้ำใหม่ในเบนซิน ได้ผลึกอสัณฐาน (Amorphous Crystal)

ค. สาร จ. ทำให้บริสุทธิ์ โดยตกผลึกในอีเทอร์ ได้ผลึกรูปเข็มเบา (0.0720 กรัม, 0.02 % เมื่อเทียบกับน้ำหนักใบแห้ง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 แสดงน้ำหนักของสารที่แยกได้จากใบ A. argentea Bl.

สาร	% ของสารที่แยกได้เมื่อเปรียบเทียบกับ น.น. ใบแห้ง
สาร ก	0.04
สาร ข	0.06
สาร ค	0.02
สาร ง	0.04
สาร จ	0.02

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งขั้นต้น (Preliminary Screening of Anticancer Activity)

ดำเนินการโดยคุณพรทิพา พิชา และคุณดาลัด จันทราพิทักษ์ แห่งสถาบันมะเร็งแห่งชาติ

2.2.3.1 วิธีที่ใช้ทดสอบ คือ KB Cell Culture System[21,22,23,24,25,26,27,28,29]

2.2.3.2 สารที่ใช้ทดสอบ คือ Crude Extract, Phenolic Part, Nonphenolic Part, สาร ก, สาร ข, สาร ค, สาร ง และ สาร จ

2.2.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.2.3.3.1 Tissue Culture Medium

ประกอบด้วย Eagle's Medium Essential Medium ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านมิลลิพอร์ เมมเบรนฟิลเตอร์ (Millipore Membrane Filter) ที่มีรูขนาด 0.22 ไมโครเซนติเมตร แล้วนำไปผสมกับเพนิซิลิน (Penicillin) 100 ยูนิต/ซม.^{3}, สเตรปโตมัยซินซัลเฟต (Streptomycin Sulfate) 100 ไมโครกรัม/ซม.^{3} และ 10 % Fetal Bovine Serum เตรียมเสร็จแล้วนำมาใช้ทันที

2.2.3.3.2 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)

สารละลาย A

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride)	8.0	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์.2 น้ำ (Calcium Chloride Dihydrate)	1.9	กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (Potassium Chloride)	4.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต. 7 น้ำ (Magnesium Sulfate Heptahydrate)	2.0	กรัม
น้ำกลั่นน้อยกว่า	500	ซม.^{3}

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารละลาย B

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต. 12 น้ำ (Disodium Hydrogen Phosphate Didecahydrate)	1.52	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium Dihydrogen Phosphate)	0.60	กรัม
กลูโคส	10.0	กรัม
1 % ฟีนอลเรด (1 % Phenol Red)	16.00	กรัม
น้ำกลั่นน้อยกว่า	500	ซม.^{3}

เทสารละลาย B ลงในสารละลาย A อย่างช้า ๆ พร้อมทั้งคนตลอดเวลา หลังจากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1.0 ลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านมิลลิพอร์ฟิลเตอร์

2.2.3.3.3 0.25 % Trypsin in HBS

นำ Trypsin 0.25 กรัม ผสมกับ HEPES-Buffered Solution 100 ซม.^{3}

2.2.3.3.4 0.4 % Trypan Blue

เตรียมเป็นน้ำยาเข้มข้น (Stock Solution)

ทริบแพนบลู (Trypan Blue)	0.4	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride)	0.81	กรัม
โปตัสเซียมฟอสเฟตโมโนเบสิค (Potassium Phosphate Monobasic)	0.06	กรัม
เมธิลพาราไฮดรอกซีเบนโซเอต (Methyl-p-hydroxybenzoate)	0.05	กรัม
น้ำกลั่นประมาณ	95.0	ซม.^{3}

ต้มสารละลายนี้ให้เดือด ทิ้งไว้ให้เย็น ปรับ pH ของสารละลายให้ได้ 7.2-7.3 ด้วย 10 นอร์มัลโซเดียมไฮดรอกไซด์ (10 Normal Sodium Hydroxide) แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 ซม.^{3} สารละลายนี้คงตัวที่อุณหภูมิห้อง

2.2.3.3.5 Phosphate Buffer Saline (PBS)

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride)	8.0	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสไฟต์ (Potassium Dihydrogen Phosphite)	0.2	กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium Hydrogen Phosphate)	2.9	กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (Potassium Chloride)	0.2	กรัม
น้ำกลั่นเจือจางให้ครบ	1.0	ลิตร

สารละลายนี้ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ 121 °ซ. ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.2.3.3.6 Lowry's Solution or Alkaline Copper Solution

สารละลาย A

โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate)	200	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide)	40	กรัม
โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรต (Sodium Potassium Tartrate)	2	กรัม
น้ำกลั่นเจือจางให้ครบ	10.0	ลิตร

สารละลาย B

คอพเพอร์ซัลเฟต. 5 น้ำ (copper Sulfate Pentahydrate)	5	กรัม
น้ำกลั่นเจือจางให้ครบ	1.0	ลิตร

ผสมสารละลาย A 50 ส่วนกับสารละลาย B 1 ส่วน ได้ Lowry's Solution C เตรียมเสร็จแล้วนำมาใช้ทันที

2.2.3.3.7 Color Reagent (Folin-Ciocalteau Reagent)

นำ Folin-Ciocalteau Phenol Reagent แต่ละชุดมาตรวจหาความเข้มข้นที่ให้ความเข้มของสีสูงสุด และเวลาที่สีมีความคงตัวนานที่สุด

2.2.3.3.8 Bovine Serum Albumin (BSA)

2.2.3.4 KB Cytotoxic Activity Screening Method

2.2.3.4.1 การเตรียม KB Single Cell Suspension

นำ KB Cell ที่เลี้ยงไว้ครบ 4 วัน มาดูด Tissue Culture Medium ออก ล้างเซลล์ด้วย HBSS 5.0 ซม.^{3} ย่อยเซลล์ให้หลุดจากผิวแก้วด้วย 0.25 % Trypsin in HBS

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวน 3-5 ซม.^{3} พอเซลล์เริ่มหลุดแต่ยังไม่เป็นเซลล์เดี่ยว (Single Cell) ดูดน้ำย่อยเซลล์ออก ใส่ Tissue Culture Medium ใหม่ลงไป 15 ซม.^{3} ทำให้เซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวโดยวิธีไปเปตติ้ง (pipetting) สักระยะหนึ่ง นำเซลล์เดี่ยวมานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วย 0.4 % Trypan Blue Solution โดยใช้ Haemocytometer เมื่อทราบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต นำ KB Single Cell Suspension มาเจือจางด้วย Tissue Culture Medium ให้มีปริมาณเซลล์ $4x10^4$ เซลล์/ซม.^{3}

2.2.3.4.2 การเตรียมสารที่ใช้ทดสอบ

สารที่ใช้ทดสอบเตรียมแล้วนำมาใช้ทันที ชั่งสารลงในโกร่งบดยา แล้วละลายใน 0.5 % DMSO in NSS (0.5 % Dimethylsulfoxide in Normal Saline) ปรับ pH ของสารละลายที่ใช้ทดสอบให้ได้ 7.2 ด้วย 0.25 นอร์มัล โซเดียมไบคาร์บอเนต (0.25 Normal Sodium Bicarbonate) หรือ 0.25 นอร์มัล ไฮโดรคลอริคแอซิค (0.25 Normal Hydrochloric Acid) ทำสารละลายที่ทดสอบให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ ซึ่งมีรูขนาด 0.45 ไมโครเซนติเมตร หลังจากนั้นเตรียมสารทดสอบให้มีความเข้มข้น เริ่มต้นจาก 30 ไมโครกรัม/ซม.^{3} จนถึง 0.625 ไมโครกรัม/ซม.^{3} (สถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกากำหนดว่า สารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่น่าจะทำการวิจัยต่อนั้น ถ้าเป็นส่วนสกัดหยาบต้องให้ค่า $ED_{50} \leqslant 30$ ไมโครกรัม/ซม.^{3} ถ้าเป็นสารบริสุทธิ์ต้องให้ค่า $ED_{50} \leqslant 4-6$ ไมโครกรัม/ซม.^{3})

2.2.3.4.3 การหาปริมาณโปรตีนเพื่อดูปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต

ดูการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยใช้วิธีของ Cyama V.I. และ Eagle H.[26] ซึ่งได้ดัดแปลงจากวิธีของ Lowry และคณะ[27] โดยใช้ Phenol Reagent (Folin-Ciocalteau) เป็นสารที่ทำให้เกิดสี

วันที่ - 0 นำ 0.5 % DMSO in NSS 1.0 ซม.^{3} (Negative Control), สารละลายของ 5-Fluouracil (5-FU) (ใช้ทดสอบว่าเซลล์มะเร็งสามารถถูกทำลายได้โดยยาต้านมะเร็ง) ความเข้มข้น 4x2.5 ไมโครกรัม/ซม.^{3} จำนวน 1.0 ซม.^{3} (Positive Control) และสารละลายที่ทดสอบความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 1.0 ซม.^{3} ใส่ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณเซลล์อยู่ $4x10^4$ เซลล์/ซม.^{3} จำนวน 3.0 ซม.^{3} ผสมเซลล์และสารทดสอบให้เข้ากัน นำขวดเลี้ยงเซลล์ไปเพาะ (Incubate) ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 4 วัน ทำการทดสอบแบบนี้ 3 ครั้ง (Triplicate Screenings)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับโปรตีนที่วันที่ - 0 ทำโดยนำเซลล์ปริมาณ $4x10^{6}$ เซลล์/ซม.^{3} จำนวน 3.0 ซม.^{3} ไปปั่นด้วยความเร็ว 1500 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูด Tissue Culture Medium ออก ล้างเซลล์ด้วย 0.5 % DMSO in NSS ดูดน้ำล้างเซลล์ออก เก็บเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ 0 °ซ. จนกว่าจะหาปริมาณโปรตีน โปรตีนส่วนนี้คือ Baseline Protein (ซึ่งใช้เพื่อตรวจดูว่าเซลล์ที่ใช้ทดสอบมีการเจริญเติบโตเป็นปกติ โดยอัตราส่วนของโปรตีนของ Negative Control ระหว่างวันที่ -4 : วันที่ -0 มีค่าเท่ากับ 6)

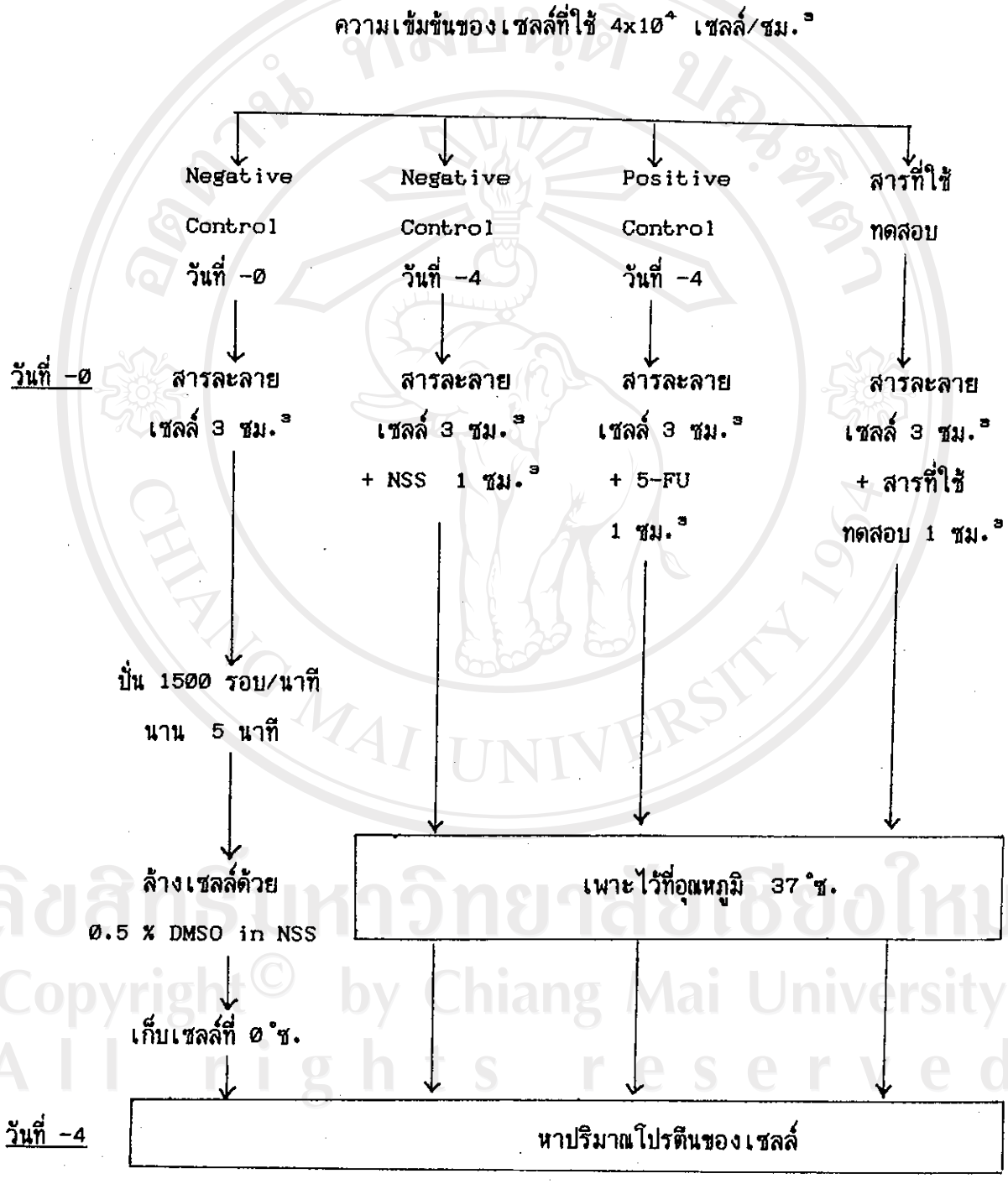
วันที่ -4 นำขวดเลี้ยงเซลล์มาคว่ำ แล้วดูด Tissue Culture Medium ออก ล้างเซลล์ด้วย PBS ครั้งละ 5 ซม.^{3} 3 ครั้ง ดูดออกแบบเดิม ทำ KB Cell Suspension โดยใช้ Lowry's Solution C 3.0 ซม.^{3} ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เขย่าเบา ๆ ให้เซลล์หลุดจากผิวแก้ว ดูดสารละลายนี้มา 1.0 ซม.^{3} เติม Lowry's Solution C 4.0 ซม.^{3} , น้ำกลั่น 1.0 ซม.^{3} และ Color Reagent 0.5 ซม.^{3} ทำการทดลองแบบขั้นต้นซ้ำอีก 2 ครั้ง สีจะเกิดขึ้นสมบูรณ์ภายใน 30 นาที สีมีความคงตัว 2 ชั่วโมง วัดความเข้มของสีช่วงคลื่น 660 นาโนเมตร

ค่าการดูดกลืนแสงของ Negative Control ของวันที่ -4 ถือว่ามีปริมาณโปรตีนเป็น 100 % สำหรับปริมาณโปรตีนในหลอดทดลองอื่น ๆ ใช้เทียบจาก Negative Control ของวันที่ -4 นี้

สำหรับ Blank และ Standard Protein (ใช้ตรวจหาความคงตัวของ Color Reagent ที่ใช้) ใช้น้ำกลั่น 1.0 ซม.^{3} และ BSA ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/ซม.^{3} จำนวน 1.0 ซม.^{3} ผสมกับ Lowry's Solution C 5.0 ซม.^{3} และเติม Color Reagent 0.5 ซม.^{3} ทำการทดลองต่อแบบเดียวกับข้างต้น โดยทำซ้ำกันอีก 2 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แผนภาพที่ 3 แสดงการทดสอบ โดยใช้ KB Cell Culture



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 ปริมาตรของสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน

	Blank	Standard Protein			Baseline Protein Day 0			Day-4		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Cell Solution (ml)	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1
BSA STandard (ml)	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-
Lowry's Solution (ml)	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4
Distilled Water (ml)	1	-	-	-	1	1	1	1	1	1
Color Reagent (ml)	Ø.5	Ø.5	Ø.5	Ø.5	Ø.5	Ø.5	Ø.5	Ø.5	Ø.5	Ø.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved