

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

สถานที่ดำเนินการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการโรคพืช หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาอารักขาพืช
คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองสำหรับการดำเนินการวิจัยต่างๆ แสดงดังตาราง 2

ตาราง 2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Agar	-	-	Thailand
Benomyl	$C_{14}H_{18}N_4O_3$	บริษัท แองโกลไทย เคมีคัล ซัพพลายส์ จำกัด	Thailand
Clorox	NaOCl	THE clorox company	USA
Dichloromethane	CH_2Cl_2	Lab-Scan	Thailand
Ethanol 95%	C_2H_5OH	Merck	Germany
Ethyl Acetate	$CH_3COOC_2H_5$	Lab-Scan	Thailand
Glucolin Glucose – D	$C_6H_{12}O_6$	บริษัท แอล.พี จำกัด	Thailand
Hexane	C_6H_{14}	Lab-Scan	Thailand
Methanol	CH_3OH	Merck	Germany
Silica gel 60	SiO_2	Merck	Germany

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่สำคัญเพื่อใช้ในการทดลอง เช่น เครื่องมือในการวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันเบื้องต้น หรือ อุปกรณ์สำหรับทดสอบการต้านเชื้อรา เป็นต้น แสดงดังตาราง 3

ตาราง 3 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือ – อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต และ รุ่น	ประเทศ
เครื่องชั่งดิจิตอล 2 ตำแหน่ง (Analytical balance)	Monobloc รุ่น PB3002-5	Switzerland
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)	Mettler foledo รุ่น AB204	Switzerland
หม้อนึ่งความดัน (autoclave)	ยี่ห้อ อิรายามา รุ่น HVA-50	Japan
เครื่องทำความเย็น (Cooling)	Buchi B-740	Switzerland
เครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ (Evaporator)	Buchi รุ่น R-114	Switzerland
เครื่องฟูริเยร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (Fourier transform infrared spectrometer)	Perkin Elmer SpectrumRX I	UK
ตู้อบฆ่าเชื้อ (oven air)	บริษัท เบคไทย รุ่น UNE 600	Germany
ตู้เจ็ยเชื้อ (laminar flow)	ห้างหุ้นส่วนจำกัด แล็บเซอร์วิส Biohazard Class II รุ่น V6	Thailand
เตาอบไมโครเวฟ (Microwave)	บริษัท แอลจีอิเล็กทรอนิกส์(ประเทศไทย) จำกัด รุ่น MS2127CW	Thailand
เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรมิเตอร์ (Nuclear Magnetic Resonance)	Varien 400 MHz magnets	USA
จานเลี้ยงเชื้อ	Petri dish	Thailand

วิธีการทดลอง

การเตรียมวัตถุดิบ

ต้นไมยราบสด จากวิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีชัยภูมิ อ.เมือง จ.ชัยภูมิ นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นจนสะอาด ฟึ่งในที่ร่มให้แห้ง และนำมาทำให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำไปอบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนแห้ง แล้วเก็บไมยราบแห้งที่ได้ในที่แห้งและเย็น เพื่อนำไปใช้ในการทดลองและวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

การเตรียมสารสกัดจากไมยราบ

นำไมยราบแห้งมาสกัดด้วยตัวทำละลายโดยการแช่สกัดไมยราบแห้ง 200 กรัม ในตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เอทานอล 95% และน้ำ โดยในตัวทำละลายเอทานอล ใช้เวลาสกัดนาน 2 สัปดาห์ และคนสารสกัดทุก ๆ 2 วัน ในส่วนสารสกัดน้ำ นำไมยราบแห้ง 200 กรัม แช่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เป็นเวลา 1 วัน โดยคนสารสกัดทุก ๆ 5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ บันทึกน้ำหนักของสารสกัดและคำนวณเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ศึกษาปริมาณฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำของไมยราบ โดยดัดแปลงจากวิธีการ Folin-Ciocalteu (Hammerschmidt และ Pratt, 1978) ดังนี้ ผสมสารสกัดไมยราบ 0.2 มิลลิลิตรกับสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu 1 มิลลิลิตร และสารละลาย 7.5% sodium carbonate 0.8 มิลลิลิตร ทั้งส่วนผสมนาน 1 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยเทียบกับกรดแกลลิก (กรัม/100 กรัม)

การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ

การทดสอบความสามารถในการต้านหรือกำจัดอนุมูลอิสระในสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำของไมยราบทำโดยการเตรียมน้ำยา ABTS โดยผสม 7 ไมโครโมลาร์ของ ABTS 5 มิลลิลิตรกับ 140 ไมโครโมลาร์ของโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) 88 ไมโครลิตร และเก็บในที่มืด 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (deionize water) ในขั้นตอนการวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูล ABTS ทำโดย หยดน้ำยา ABTS 1.8 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีสารที่ต้องการทดสอบหรือน้ำที่ปราศจากไอออน ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 6 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็น blank คำนวณความสามารถในการกำจัดอนุมูล $ABTS^{•+}$ เป็นร้อยละ (Re et al., 1999) จากสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ความสามารถกำจัดอนุมูล ABTS (\%)} = [1 - (A_{734 \text{ sample}} / A_{734 \text{ deionize water}})] \times 100$$

เมื่อ $A_{734 \text{ sample}}$ และ $A_{734 \text{ deionize water}}$ เป็นค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตรของสารทดสอบและของน้ำที่ปราศจากไอออน ตามลำดับ เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารทดสอบกับความเข้มข้นของ Trolox ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามิน อี โดยผลการวิเคราะห์จะคำนวณเป็นค่าที่สัมพันธ์กับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox จึงมีชื่อว่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

การแยกสารสำคัญเบื้องต้นด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสารสกัดเอทานอลของไมยราบ แยกองค์ประกอบสารสำคัญเบื้องต้นด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว (quick column chromatography) โดยใช้ silica gel 60 บรรจุในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10.0 เซนติเมตร และสูง 4.0 เซนติเมตร ผสมสารสกัดกับ silica และใส่ในคอลัมน์ จะด้วยตัวทำละลายโดยเพิ่มสภาพความเป็นขั้วของตัวทำละลายจากขั้วน้อยไปขั้วมาก คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ ในอัตราส่วนต่างๆ ระเหยตัวทำละลายภายใต้ความดันต่ำ บันทึกร้อยละผลผลิต ลักษณะสารที่แยกได้ และตรวจสอบสารสำคัญในแต่ละ fraction ที่เหมือนกัน ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิคสเปกโทรสโกปี

พิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลของไมยราบที่แยกองค์ประกอบด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ด้วยเทคนิคทีนเลเซอร์โครมาโทกราฟี และ $^1\text{H-NMR}$

การวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลต วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี

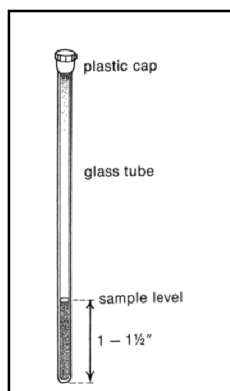
เตรียมสารสกัดที่มีความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งสารสกัด 50 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล และใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล แล้วทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200-700 nm ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลต วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี

การศึกษาหมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

นำสารสกัดเอทานอลของไมยราบหยดลงบนแผ่น NaCl เตรียมเป็นแผ่นฟิล์มบาง แล้วนำไปวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารสกัดด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ในช่วงความยาวคลื่น $400 - 4000\text{ cm}^{-1}$

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดหยาบด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี

นำสารสกัดละลายด้วย CDCl_3 และใส่ในหลอด NMR โดยเติมสารละลายตัวอย่างที่เตรียมในปริมาณ 0.6 – 0.8 มิลลิลิตรให้ระดับของสารตัวอย่างในหลอด NMR สูงประมาณ 3 – 4 เซนติเมตร ดังภาพ 6 นำมาวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมที่ 400 MHz



ภาพ 6 ระดับของสารตัวอย่างที่เหมาะสม

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เป็นสาเหตุ ของโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้

การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา ของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

นำเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ผ่านการพิสูจน์โรคแล้วตามวิธีของ Koch's postulates (อธิบายในภาคผนวก) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เข็มปลายของตัดชิ้นวัฏบริเวณที่ปลายเส้นใยเจริญจาก Slant เชื้อรา *C. gloeosporioides* วางชิ้นวัฏบนกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มในเอทานอล 95% แล้วลนไฟฆ่าเชื้อ รอให้ Cork borer เย็นลง จึงตัดปลายเส้นใยของเชื้อรา นำชิ้นวัฏของเชื้อราที่ตัดแล้วมาวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) โดยให้ด้านที่มีเชื้อราสัมผัสผิวหน้าอาหาร บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน แล้วจึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การศึกษาผลของสารสกัดไมยราบต่อการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides*

ศึกษาผลของสารสกัดไมยราบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) นำเชื้อรา *C. gloeosporioides* อายุ 7 วัน มาทดสอบด้วยวิธี Poisoned food technique บนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดไมยราบที่ความเข้มข้น 100, 500, 1,000, 5,000, 10,000, 20,000 ppm

ตามลำดับ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และเปรียบเทียบข้อมูล กับการใช้ สารเคมียับยั้งเชื้อรา ได้แก่ Benomyl ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm บันทึกการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา (นิภาดา และคณะ, 2554)

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากไมยราบในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

นำผลมะม่วงน้ำดอกไม้ที่สุกแก่เต็มที่มาล้างด้วยน้ำให้สะอาด ตากลมให้แห้ง นำมาทดลองโดยจุ่มผลมะม่วงใน 4 สภาวะการทดลอง ได้แก่ การจุ่มในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สารเคมี benomyl ที่ 500 ppm ในสารสกัดเอทานอล และน้ำจากไมยราบ ที่ความเข้มข้น 20,000 ppm เป็นเวลา 5 นาที ตากลมให้แห้ง แล้วใช้เข็มทำแผล 3 แผล แล้วใช้ cork borer เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่อายุ 10 วัน แล้วย้ายมาวางบนผลมะม่วง แล้วนำไปบ่มไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการวัดขนาดแผลของการเกิดโรคและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* (วิชัย และชัยณรงค์, 2548)