

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การคำนวณหาผลผลิตที่ได้ (เปอร์เซ็นต์)

การคำนวณหาผลผลิตที่ได้ (ร้อยละ)

สูตรที่ใช้ในการคำนวณหาร้อยละผลผลิต

$$\text{ผลผลิตที่ได้ (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักผลผลิตที่ได้}}{\text{น้ำหนักพืชก่อนการสกัด}} \times 100$$

ตัวอย่างการคำนวณ

จากการนำไมยราบแห้ง 200 กรัม แช่ในเอทานอลเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วกรองสารสกัดที่ได้ จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ ทำให้ได้สารสกัดหยาบ 9.86 กรัม สามารถคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้จาก

$$\begin{aligned} \% \text{ ผลผลิตที่ได้} &= \frac{\text{น้ำหนักผลผลิตที่ได้}}{\text{น้ำหนักพืชก่อนการสกัด}} \times 100 \\ &= \frac{9.86 \text{ g} \times 100}{200 \text{ g}} \\ &= 4.93 \% \end{aligned}$$

หมายเหตุ การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ คำนวณด้วยวิธีเดียวกัน

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย

$$\text{การยับยั้งการเจริญของเส้นใย (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

โดย A คือ ค่าเฉลี่ยของการเจริญเส้นใยในชุดควบคุม, B คือ ค่าเฉลี่ยของการเจริญเส้นใยในชุดทดสอบ (นิภาดา และคณะ, 2554)

ตัวอย่างการคำนวณ

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใย ข้อมูล ณ วันที่ 8 ของการทดลอง พบว่า ชุดควบคุม มีค่าเฉลี่ยของการเจริญของเส้นใยอยู่ที่ 8.11 เซนติเมตร และค่าเฉลี่ยของการเจริญของเส้นใยในชุดทดสอบ ที่ความเข้มข้น 20,000 ppm เท่ากับ 2.92 เซนติเมตร สามารถคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยได้จาก

$$\begin{aligned} \% \text{ การยับยั้งการเจริญของเส้นใย} &= \frac{A - B}{A} \times 100 \\ &= \frac{8.11 - 2.92 \text{ cm}}{8.11 \text{ cm}} \times 100 \\ &= 64.00 \% \end{aligned}$$

หมายเหตุ การคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการเจริญของเส้นใยที่ความเข้มข้นอื่น ๆ คำนวณด้วยวิธีเดียวกัน

ภาคผนวก ข

หลักการของเทคนิคต่างๆที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร

หลักการของเทคนิคต่างๆที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร

หลักการการแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

เป็นเทคนิคที่แยกสารให้บริสุทธิ์จากของผสม การแยกสารโดยเทคนิคนี้แยกโดยผ่านของผสมลงในคอลัมน์ที่บรรจุตัวดูดซับหรือสารค้ำจุนที่มีเฟสคงที่เคลือบอยู่ แล้วชะด้วยเฟสเคลื่อนที่ สารในของผสมจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราที่ไม่เท่ากัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแรงดึงดูดระหว่างสารกับตัวดูดซับ (ประนอม, 2548) เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว (quick column chromatography) เพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด โดยอาศัยหลักการการเคลื่อนที่ของสารเคมีต่างชนิดกันบนตัวกลางในตัวทำละลายชนิดเดียวกันจะมีความเร็วต่างกัน ทำโดยการเตรียมคอลัมน์สำหรับแยกโดยการวางกระดาษกรองบน sintered glass ภายในของกรวยแก้ว ต่อปลายด้านล่างกรวยแก้วกับบี๊มดูดอากาศ ขณะเปิดบี๊มดูดอากาศเทซิลิกาเจลลงไปแล้วกดให้ซิลิกาเจลอัดแน่น และเรียบสม่ำเสมอ จนความสูงของซิลิกาเจลประมาณ 5 เซนติเมตร นำสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการแยกมาคลุกกับซิลิกาเจลจนเป็นผงร่วน ค่อยๆ เทของผสมดังกล่าวลงในคอลัมน์ เคลี่ยให้เรียบและกดให้แน่น ปิดทับผิวหน้าด้วยกระดาษกรองอีกครั้ง เทตัวทำละลายที่ใช้สำหรับชะสารลงไป ตัวทำละลายที่ใช้สำหรับชะสารประกอบด้วย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท เมทานอล และน้ำ ผสมกัน ในอัตราส่วนต่างๆ นำสารละลายที่ชะได้แต่ละส่วนไปกลั่นแยกตัวทำละลายออกด้วยการกลั่นแบบลดความดัน โดยใช้ rotary evaporator

คอลัมน์

เทคนิคในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีนั้น คอลัมน์ที่ใช้ในโครมาโทกราฟีจะมีลักษณะเป็นหลอดแก้วกลวง ปลายข้างหนึ่งทำให้เส็กลงเพื่อต่อเข้ากับตัวควบคุมการไหลของตัวทำละลาย ความสูงและขนาดของเฟสคงที่ที่บรรจุในคอลัมน์จะมีผลต่ออัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ถ้าเฟสคงที่มีขนาดเล็กและบรรจุในคอลัมน์สูงมาก ๆ จะทำให้การไหลของเฟสเคลื่อนที่ช้ามาก ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ซึ่งในตารางผนวก 1 แสดงความสัมพันธ์ของคอลัมน์กับปริมาณสารที่ต้องการแยกและตัวดูดซับ

ตารางผนวก 1 ความสัมพันธ์ของคอลัมน์กับปริมาณสารที่ต้องการแยกและตัวดูดซับ

สาร (g)	ตัวดูดซับ (g)	เส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์ (mm)	ความยาวของคอลัมน์ (mm)
0.01	0.3	3.5	30
0.10	3.0	7.5	60
1.00	30.0	16.0	130
10.00	300.0	34.0	280

ตัวดูดซับ

สำหรับของแข็งที่ใช้บรรจุคอลัมน์ ต้องมีคุณสมบัติความมีขี้วมมากกว่าเฟสเคลื่อนที่ การเลือกใช้ของแข็งต้องให้เหมาะสมกับชนิดของสารตัวอย่าง ของแข็งที่ทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับของแข็งที่จะนำมาบรรจุในคอลัมน์ ต้องมีขนาดสม่ำเสมอ ขนาดของแข็งจะมีผลต่อเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์และประสิทธิภาพของคอลัมน์ ดังนั้นขนาดที่ใช้ควรเหมาะสม ของแข็งที่นำมาใช้ต้องไม่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ เนื่องจากการดูดซับของสารตัวอย่างขึ้นอยู่กับขี้วของตัวดูดซับหรือเฟสคงที่ นั่นคือ การเพิ่มขี้วของตัวดูดซับจะทำให้การดูดซับเพิ่มขึ้น โดยเรียงตามขี้ว ของแข็ง อะลูมินา และซิลิกาเจล จะเป็นตัวที่นิยมใช้มากที่สุด สำหรับซิลิกาเจล คือ ของแข็งพอลิเมอร์ของกรดซิลิกิก (H_2SiO_3) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ซิลินอล (Si-OH) ทำหน้าที่ดูดซับ (ประเสริฐ, 2544) ความเป็นขี้วของตัวดูดซับแสดงดังตารางผนวก 2

summa	16.507
carbon	
silica	
Carbon on silica	
silica on carbon	
silica on carbonate	
carbon	16.507
silica	

ภาพผนวก 1 ความเป็นขี้วของตัวดูดซับ

หลักการตรวจสอบโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC) หรือโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบางจัดเป็น planar chromatography อีกชนิดหนึ่ง ถ้าตัวดูดซับ (absorbent) เป็นเฟสที่อยู่กับที่ซึ่งถูกเคลือบบางๆบนแผ่นแก้วหรือแผ่นพลาสติก โดยมี Gypsum ($\text{CaSO}_4 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$) เป็นตัวยึดเหนี่ยว (binder) กลไกในการแยกส่วนมากจะเป็น absorption

หลักการ

ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography ; TLC) เป็นกระบวนการแยกสารที่ผสมกันโดยใช้เครื่องมือที่เป็นแผ่นแก้วฉาบด้วยตัวดูดซับชนิดที่เหมาะสมโดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสารซึ่งมีอัตราเร็วในการเคลื่อนที่แตกต่างกัน อันเป็นผลมาจากความสามารถของตัวดูดซับที่มีต่อสารแต่ละชนิดไม่เท่ากัน ซึ่งมีหลักการและเทคนิคของการวิเคราะห์เหมือนกับวิธีเปเปอร์โครมาโทกราฟีทุกประการ แตกต่างกันที่ตัวเฟสที่แทนที่จะเป็นแผ่นกระดาษ แต่ใช้ของแข็งดูดซับเคลือบเป็นแผ่นบางๆ บนแผ่นแก้วหรือพลาสติก หรือแผ่นอะลูมิเนียม ตามปกติแผ่นบางๆ ของของแข็งที่เคลือบบนแผ่นแก้วจะมีความหนาระหว่าง 0.10-1.0 มิลลิเมตร วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ได้กว้างขวางกว่าวิธีเปเปอร์โครมาโทกราฟี เพราะสามารถเลือกใช้เฟสคงที่ได้หลายชนิด สำหรับตัวทำละลายที่ทำหน้าที่เป็นตัวชะหรือสารดีเวลลอปทุกตัวที่สามารถใช้ในวิธีเปเปอร์โครมาโทกราฟี จะสามารถนำมาใช้วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีได้ทั้งหมด โดยการเลือกของแข็งที่เป็นตัวดูดซับและตัวชะที่เข้าคู่กันได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม จะทำให้สามารถแยกสารออกจากกันเป็นอย่างดี (ประนอม, 2548 ; ประเสริฐ, 2544)

การรายงานผลจะรายงานจำนวนจุดที่ปรากฏบนแผ่น TLC ค่า R_f ซึ่งการแสดงผลจะสังเกตได้จากการ spray หรือส่องภายใต้แสง UV

$$\text{ค่า } R_f = \frac{\text{ระยะที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ solvent เคลื่อนที่}}$$

ในการทดสอบ TLC นั้นเพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นก่อนจะนำสารสกัดที่ได้มาแยกสารสำคัญด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

การเลือกใช้ตัวทำละลายสำหรับการแยกสาร ในกรณีที่สารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์เป็นสารที่ไม่ทราบว่าเป็นอะไร หรือไม่มีการรายงานมาก่อนว่า ควรใช้ตัวทำละลายชนิดใด

จะต้องมีการทดสอบ โดยการทดลองเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสม การทดลองเลือกใช้ตัวทำละลายมีกฎเกณฑ์ว่า ควรเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีโพลาริตีต่ำสุดก่อน แล้วค่อยเพิ่มไปเรื่อยๆ จนกว่าจะได้ตัวทำละลายที่สามารถแยกออกได้อย่างเหมาะสม ตาราง 3 เป็นตารางที่แสดงโพลาริตีของตัวทำละลายชนิดต่างๆ เรียงจากน้อยไปหามาก ตามค่าคงที่ไดอิเล็กตริก สำหรับตัวทำละลายที่นำมาใช้ในการดีเวลลอปได้นั้น ต้องมีคุณสมบัติที่เหมาะสมดังนี้คือ

1. ต้องมีความหนืดต่ำ (low viscosity) เพื่อให้เคลื่อนที่ได้เร็ว
2. ถ้าจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายผสม ควรทำเป็นตัวทำละลายผสมที่น้อยชนิด

เพราะถ้าผสมหลายชนิดจะมีโอกาสผิดพลาดได้ง่ายในการเตรียมส่วนผสม

3. ถ้าเป็นสารผสมต้องสามารถผสมได้เป็นเนื้อเดียวกันจึงจะนำมาใช้ได้

(homogeneous)

4. ต้องมีความบริสุทธิ์สูง ความบริสุทธิ์ในที่นี้ไม่ได้หมายความว่า ต้องปราศจากแร่ธาตุหรือสิ่งเจือปนทั้งหมด 100% แต่ความบริสุทธิ์ในที่นี้หมายถึงว่า ไม่มีตัวทำละลายตัวอื่นที่มีโพลาริตีตรงข้ามกับตัวทำละลายที่ใช้ปนอยู่ด้วย

ตารางผนวก 2 ค่าความเป็นขั้วของตัวทำละลาย

ตัวทำละลาย	ค่าคงที่ไดอิเล็กตริก
Hexane	1.89
Cyclohexane	2.02
1,4-Dioxane	2.21
Carbontetrachloride	2.24
Toluene	2.38
Diethylether	3.34
Ethyl acetate	6.02
Acetic acid, gracial	6.15

ตารางผนวก 2 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	ค่าคงที่ไดอิเล็กตริก
Dichloromethane	9.14
Pyridine	12.3
Acetone	20.7
Ethanol	23.3
Methanol	33.6
Water	78.3

การนำไปใช้ประโยชน์

ลักษณะการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของทินเลเซอร์โครมาโตกราฟีจะมีเทคนิคของการวิเคราะห์เหมือนกับวิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟี ทินเลเซอร์โครมาโตกราฟีถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการตรวจพิสูจน์ทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ เช่น

1. ใช้ตรวจหาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาว่าเป็นชนิดอะไร ปฏิกิริยานั้นให้ผลิตภัณฑ์อะไรบ้าง ปฏิกิริยานั้นเกิดขึ้นสมบูรณ์หรือไม่
2. ใช้ตรวจวิเคราะห์ จำแนกชนิดของยา ยาเสพติด
3. ใช้จำแนกชนิดของสารพิษ เช่น ยาฆ่าแมลง ยา
4. ใช้ในการแยกสารที่ได้จากสมุนไพร
5. ใช้หาความสัมพันธ์ก่อนนำสารไปแยกด้วยวิธี Column Chromatography
6. ใช้ยืนยันผลการตรวจแยกออกเป็น fraction ต่าง ๆ จาก Column Chromatography
7. ใช้ในการตรวจสอบสารตัวอย่างแบบ screen เพื่อหารั่ว ๆ ว่าเป็นสารในกลุ่มใด

หลักการอัลตราไวโอเลต และฟลูออโรสเปกโตรสโกปี

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่า intensity ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อนและสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้

คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่าเมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่มีความยาวคลื่นค่าต่าง ๆ ตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ ใช้ประโยชน์ทั้งในด้านพิสูจน์โครงสร้างและหาปริมาณของสาร ในปัจจุบันยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปีเป็นเทคนิคที่มีความสำคัญทางวิทยาศาสตร์เป็นอย่างยิ่ง เพราะถือว่าเป็นเทคนิคที่ง่าย ถูกต้องแม่นยำและใช้กันอย่างกว้างขวาง

หลักการฟูริเยร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี

เครื่องฟูริเยร์ ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (Fourier transform infrared spectrometer, FTIR) เป็นหนึ่งในเทคนิคทางด้าน Infrared spectroscopic ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกประเภทของสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และพันธะเคมีในโมเลกุล รวมถึงสามารถบอกถึงปริมาณองค์ประกอบที่มีอยู่ในโมเลกุลของสารผสมตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิด เทคนิค FTIR นี้มีความไว ใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบน้อยกว่าเทคนิคอื่นๆ

หลักการ

รังสีอินฟราเรดเป็นช่วงหนึ่งของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นในช่วง 0.78-1,000 ไมโครเมตร หรือ wavenumber ในช่วง 12,800 ถึง $10\text{ cm}^{-1} = 1/\text{wavelength (cm)}$ โดยในช่วงของรังสีอินฟราเรดจะแบ่งเป็น 3 ช่วงได้แก่

1. ช่วงใกล้อินฟราเรด (near infrared) คือช่วง wavenumber 12,800–4,000 cm^{-1} เป็นช่วงที่เกิดโอเวอร์โทน (overtone region) มีประโยชน์ในการวิเคราะห์สารประกอบอะโรมาติก
2. ช่วงกลางอินฟราเรด (middle infrared) หรือ fundamental region แบ่งออกเป็น
 - 2.1 Group-frequency region เป็นช่วงที่อยู่ระหว่าง 4,000 – 1,300 cm^{-1} หรือ 2.5 – 8 cm^{-1} ซึ่งสเปกตรัมที่ได้ในช่วงนี้ส่วนใหญ่ได้จากพวกหมู่ฟังก์ชัน (Functional groups) แต่ไม่ให้ข้อมูลโครงสร้างที่สมบูรณ์

2.2 Finger print region เป็นช่วงที่อยู่ระหว่าง $1,300 - 650 \text{ cm}^{-1}$ สเปกตรัมที่ได้ในช่วงนี้ส่วนใหญ่เกิดจากโครงสร้างของโมเลกุลที่สมบูรณ์ ดังนั้นสเปกตรัมที่ได้จึงค่อนข้างยุ่งยาก การวิเคราะห์ต้องเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารที่ทราบโครงสร้างแล้ว

3. ช่วงไกลอินฟราเรด (far infrared) คือช่วงนี้ไม่ค่อยจะใช้ในการวิเคราะห์ เนื่องจากสเปกตรัมมักจะเกิดจากการสั่นของโครงสร้างหรือเกิดจากการหมุนของโมเลกุล ช่วงที่จะใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ในการวิเคราะห์นั้น เป็นช่วงอินฟราเรดเป็นส่วนใหญ่ คือ จาก $4,000$ ถึง 400 cm^{-1} หรือ 2.5 ถึง $25 \mu\text{m}$ สำหรับช่วงเลขคลื่นที่นิยมนำมาใช้งานวิเคราะห์สาร คือ ช่วงกลางอินฟราเรด (middle infrared) กระบวนการดูดกลืนแสงอินฟราเรด จะเกิดขึ้นที่สภาวะเหมาะสม คือ

สภาวะที่ 1 ต้องมีพลังงานที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการทรานซิชัน

สภาวะที่ 2 สนามไฟฟ้าที่เกิดจากการแผ่รังสีกับสารตัวอย่าง จะต้องเกิดการคู่ควบ (coupling) กันพอดี เมื่อเกิดการดูดพลังงานจึงทำให้โมเมนต์ขั้วคู่ของโมเลกุลนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงไป

การวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสารตัวอย่างด้วยเทคนิคนี้ จะใช้ในการทำนายหมู่ฟังก์ชันและโครงสร้างของสารตัวอย่างเป็นหลัก โดยอาศัยการพิจารณาจากความถี่ที่สารเกิดการดูดกลืนรังสี รูปเครื่องฟูริเยร์ทรานสฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ แสดงดังภาพผนวก 2



ภาพผนวก 2 เครื่องฟูริเยร์ทรานสฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์

ที่มา : Regents of New Mexico State University. (2006 : ระบบออนไลน์)

ข้อดีของ FTIR

1. ช่วยให้การวิเคราะห์ หรือการวัดสเปกตรัมของสารตัวอย่าง ทำได้รวดเร็วกว่าเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ธรรมดาหลายเท่า

2. FTIR วัดที่ความถี่ต่าง ๆ อย่างต่อเนื่อง (Sequentially) แต่เครื่องธรรมดาจะเป็นแบบวัดทีละความถี่

3. FTIR ใช้ช่องทางเข้าทรงกลม (Circular entrance aperture) แทนช่องทางเข้าเล็ก ๆ ให้ลำแสงผ่าน ทำให้ได้กำลังแสงสูงขึ้น

4. ช่วยทำให้การแยก (Resolution) และความถูกต้องดีขึ้น

5. ช่วยทำให้การวิเคราะห์ง่ายและสะดวกขึ้นด้วยการใช้คอมพิวเตอร์ควบคุมการทำงาน

ข้อเสียของ FTIR

1. FTIR เป็นเครื่องที่มีราคาแพง ต้องเสียค่าดูแลและบำรุงรักษา

2. FTIR ต้องอยู่ในห้องที่ควบคุมความชื้นตลอดเวลา

หลักการนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี

เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Nuclear magnetic resonance spectrometer ; NMR) เป็นเทคนิคเกี่ยวข้องกับการวัดระดับพลังงานที่แตกต่างกันของนิวเคลียสที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของสนามแม่เหล็ก เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากในการศึกษาเกี่ยวกับสูตรโครงสร้างของสาร ไม่ว่าจะเป็นสารอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจาก NMR เป็นเทคนิคที่ศึกษาเกี่ยวกับนิวเคลียส ตลอดจนสถานะข้างเคียงรอบนิวเคลียสนั้นๆ ด้วย นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ในการทำปริมาณวิเคราะห์ได้ด้วย (แมน, 2554)

หลักการ

นิวเคลียสเป็นอนุภาคที่มีประจุ ในนิวเคลียสของธาตุบางอย่างประจุนี้จะหมุน (Spin) เป็นวงรอบแกนนิวเคลียส (Nuclear axis) เช่นเดียวกับอิเล็กตรอน ซึ่งเป็นอนุภาคที่มีประจุซึ่งหมุนรอบนิวเคลียส การสปีนของนิวเคลียสนี้ จะก่อให้เกิดโมเมนต์แม่เหล็กบริเวณแกนของการหมุน ^1H มีเลขสปีนควอนตัมเป็น $1/2$ และมีค่าที่เป็นไปได้เพียง 2 ค่า คือ $+1/2$ และ $-1/2$ เมื่อให้สนามแม่เหล็กภายนอก (External หรือ Applied magnetic field, B_0) แก่นิวเคลียสสปีนซึ่งเคยวางตัวในแบบสุ่มได้ทุกทิศทางจะจัดตัวใหม่ และจะมีนิวเคลียสแมกเนติกโมเมนต์ที่เป็นไปได้เพียงสอง

แบบ คือ นิวเคลียสที่มีสปิน +1/2 จะวางตัวในแนวขนานกับแนวของ B_0 , มีทิศทางเดียวกับ B_0 และ เป็นสถานะที่มีพลังงานต่ำ (เรียกว่า α) ส่วนนิวเคลียสที่มีสปิน -1/2 ก็จะวางตัวในแนวขนานกับ แนวของ B_0 และจะมีพลังงานสูงกว่า (เรียกว่า β)

เมื่อนิวเคลียสที่ระดับพลังงานต่ำได้รับพลังงานที่เหมาะสม กล่าวคือ เท่ากับ ΔE ก็ จะเปลี่ยนนิวเคลียสสปิน และขึ้นไปอยู่ที่ระดับพลังงานที่สูง เรียกว่าการกลับตัว (Flip) ของสปินใน ทำนองเดียวกันนิวเคลียสที่ระดับพลังงานสูงก็สามารถเปลี่ยนนิวเคลียสสปิน เป็นสปินตรงกันข้าม พร้อมกับการคายพลังงานออกมาในปริมาณเท่ากับ ΔE ได้ การเปลี่ยนแปลงแบบนี้ เรียกว่า เรโซแนนซ์ (Resonance)

ความแตกต่างของระดับพลังงานสองระดับนี้เขียนเป็นความสัมพันธ์กับความแรง สนามแม่เหล็กได้ตามสมการ 1

สมการ 1

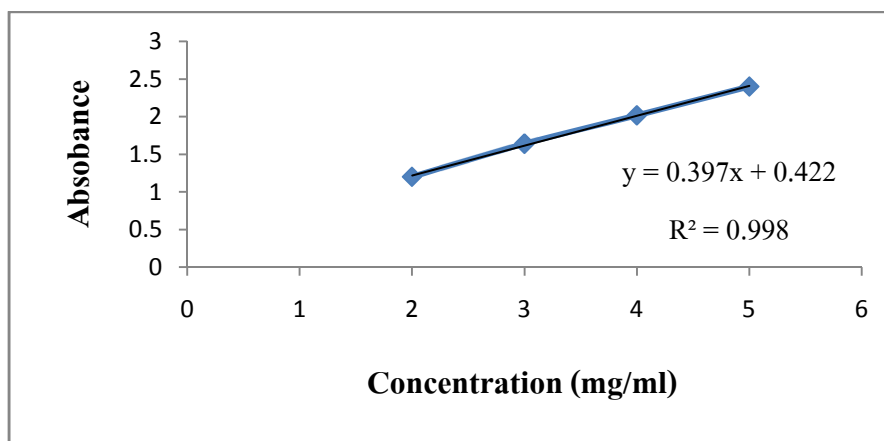
$$\Delta E = \frac{h\gamma}{2\pi} B_0$$

เมื่อ h คือค่าคงที่ของพลังค์ (Plank's constant) และ γ คือค่าคงที่ Gyromagnetic ratio ซึ่งเป็นค่าเฉพาะตัวของนิวเคลียสแต่ละชนิด โดยโปรตอนจะมีค่า $2.675 \times 10^8 \text{ T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ดังนั้นจะ เห็นว่า ΔE จะขึ้นกับชนิดของนิวเคลียส และความแรงของสนามแม่เหล็กภายนอก (B_0) (หน่วยเป็น เทสลา, T) โดยหากความแรงของสนามแม่เหล็กเพิ่มขึ้น ΔE ก็จะมีค่าเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้แม้ว่า จะเป็นนิวเคลียสชนิดเดียวกัน แต่ถ้าอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน ก็จะมีค่า ΔE ที่แตกต่างกันด้วย จึงทำให้ NMR เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากในการศึกษาโครงสร้างของสาร

ภาคผนวก ค

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและผลการทดสอบสารสกัดเอทานอล
และน้ำของไมยราบต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก



ภาพผนวก 3 กราฟการหาปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดเอทานอลของไมยราบ

ผลการทดสอบสารสกัดเอทานอลและน้ำของไมยราบต่อการยับยั้ง

เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

ตารางผนวก 3 ผลการทดสอบสารสกัดเอทานอลของไมยราบต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (ตัวทำลายเอทานอล)

ชุดการทดลอง/วัน	การเจริญของเส้นใย (เซนติเมตร)			
	2	4	6	8
น้ำกลั่น	2.01±0.051 ^d	4.25±0.027 ^f	6.28±0.037 ^h	8.11±0.037 ^h
สารเคมี benomyl	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a
100 ppm	1.94±0.0914 ^d	3.75±0.035 ^e	5.18±0.098 ^g	6.97±0.121 ^g
500 ppm	1.57±0.046 ^c	3.40±0.022 ^d	4.92±0.062 ^f	6.19±0.053 ^f
1,000 ppm	1.24±0.033 ^b	2.25±0.035 ^c	3.54±0.071 ^c	4.78±0.111 ^c
5,000 ppm	0.00±0.000 ^a	1.63±0.046 ^b	2.64±0.058 ^d	4.31±0.048 ^d
10,000 ppm	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a	1.68±0.046 ^c	3.19±0.048 ^c
20,000 ppm	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a	1.32±0.075 ^b	2.92±0.054 ^b

หมายเหตุ ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่มีตัวอักษรกำกับในแนวดิ่งต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ตารางผนวก 4 ผลการทดสอบสารสกัดเอทานอลของไมยราบต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (ตัวทำลายน้ำ)

ชุดการทดลอง/วัน	การเจริญของเส้นใย (เซนติเมตร)			
	2	4	6	8
น้ำกลั่น	1.95±0.045 ^g	3.42±0.080 ^h	6.77±0.139 ^g	8.29±0.091 ^g
สารเคมี benomyl	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a
100 ppm	1.83±0.044 ^f	3.01±0.048 ^g	5.67±0.101 ^f	7.51±0.118 ^f
500 ppm	1.79±0.051 ^f	2.70±0.035 ^f	4.91±0.127 ^c	6.24±0.162 ^c
1,000 ppm	1.57±0.041 ^c	2.53±0.046 ^c	4.35±0.069 ^d	5.59±0.048 ^d
5,000 ppm	1.31±0.033 ^d	2.20±0.045 ^d	4.12±0.044 ^d	5.33±0.066 ^d
10,000 ppm	1.10±0.016 ^c	1.90±0.050 ^c	3.54±0.118 ^c	4.58±0.197 ^c
20,000 ppm	0.75±0.035 ^b	1.54±0.043 ^b	3.26±0.064 ^b	4.00±0.135 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยการเจริญของเส้นใยที่มีตัวอักษรกำกับในแนวดิ่งต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ตารางผนวก 5 ผลการทดสอบสารสกัดน้ำของไมยราบต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (ตัวทำลายเอทานอล)

ชุดการทดลอง/วัน	การเจริญของเส้นใย (เซนติเมตร)			
	2	4	6	8
น้ำกลั่น	2.25±0.089 ^c	4.30±0.059 ^c	6.34±0.093 ^f	8.20±0.095 ^f
สารเคมี benomyl	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a
100 ppm	1.66±0.108 ^d	3.03±0.122 ^d	4.78±0.139 ^c	6.15±0.223 ^c
500 ppm	1.38±0.049 ^c	2.55±0.061 ^c	4.06±0.033 ^d	5.06±0.207 ^d
1,000 ppm	1.18±0.044 ^b	2.23±0.068 ^b	3.52±0.066 ^c	4.36±0.114 ^c
5,000 ppm	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a	0.99±0.069 ^b	1.82±0.070 ^b
10,000 ppm	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a
20,000 ppm	0.00±0.000	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยการเจริญของเส้นใยที่มีตัวอักษรกำกับในแนวดิ่งต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ตารางผนวก 6 ผลการทดสอบสารสกัดเอทานอลิกของไมยราบต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (ตัวทำลายผลไม้)

ชุดการทดลอง/วัน	การเจริญของเส้นใย (เซนติเมตร)			
	2	4	6	8
น้ำกลั่น	2.88±0.030 ^g	4.66±0.128 ^g	6.56±0.033 ^h	8.39±0.018 ^h
สารเคมี benomyl	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a
100 ppm	2.59±0.043 ^f	3.80±0.047 ^f	5.66±0.024 ^g	7.01±0.036 ^g
500 ppm	2.41±0.029 ^e	3.54±0.037 ^e	5.33±0.034 ^f	6.60±0.045 ^f
1,000 ppm	2.34±0.024 ^e	3.41±0.029 ^{d,e}	5.15±0.027 ^e	6.28±0.012 ^e
5,000 ppm	2.04±0.048 ^d	3.26±0.010 ^d	4.71±0.43 ^d	5.84±0.033 ^d
10,000 ppm	1.63±0.034 ^c	3.04±0.018 ^c	4.42±0.030 ^c	5.37±0.051 ^c
20,000 ppm	1.49±0.024 ^b	2.70±0.061 ^b	3.99±0.056 ^b	4.78±0.056 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยการเจริญของเส้นใยที่มีตัวอักษรกำกับในแนวตั้งต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ตารางผนวก 7 ผลการทดสอบสารสกัดเอทานอลิกของไมยราบ และสารสกัดน้ำของไมยราบต่อการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้

ชุดการทดลอง/วัน	ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของแผลบนผลมะม่วง (เซนติเมตร)				
	2	4	6	8	%การยับยั้ง
น้ำกลั่น	0.53±0.061 ^c	0.77±0.084 ^b	1.43±0.095 ^b	2.88±0.054 ^b	0.000 ±0.000 ^a
สารเคมี benomyl	0.12±0.490 ^a	0.59±0.054 ^{ab}	0.98±0.105 ^a	2.14±0.130 ^a	25.80±3.682 ^b
น้ำอุ่น	0.29±0.082 ^{ab}	0.52±0.042 ^a	0.93±0.047 ^a	2.39±0.151 ^{ab}	16.65±6.305 ^{ab}
สารสกัดเอทานอล	0.32±0.070 ^b	0.53±0.040 ^a	0.88±0.082 ^a	2.22±0.189 ^a	22.45±7.443 ^b
20,000 ppm					
สารสกัดน้ำ	0.36±0.040 ^{bc}	0.54±0.114 ^a	0.90±0.162 ^a	2.38±0.317 ^{ab}	17.06±9.848 ^{ab}
20,000 ppm					

หมายเหตุ ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่มีตัวอักษรกำกับในแนวตั้งต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ตาราง 8 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งเชื้อราของสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอล (ในตัวอย่างละลายเอทานอลและน้ำ)

ชุดการทดลอง	% การยับยั้งของแต่ละสารสกัด			
	สารสกัดเอทานอล (ตัวอย่างละลายเอทานอล)	สารสกัดเอทานอล (ตัวอย่างละลายน้ำ)	สารสกัดน้ำ (ตัวอย่างละลายน้ำ)	สารสกัดน้ำ (ตัวอย่างละลายเอทานอล)
น้ำกลั่น	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a	0.00±0.000 ^a
สารเคมี benomyl	100.00±0.000 ^a	100.00±0.000 ^a	100.00±0.000 ^a	100.00±0.000 ^a
100 ppm	14.06±1.504 ^b	9.40±0.968 ^a	16.51±0.562 ^b	25.00±1.498 ^c
500 ppm	23.67±0.761 ^a	24.73±1.918 ^a	21.33±0.479 ^a	38.29±1.285 ^b
1,000 ppm	41.06±1.230 ^c	32.57±1.090 ^b	25.15±0.295 ^a	46.83±0.582 ^d
5,000 ppm	46.86±0.584 ^c	35.71±0.830 ^b	30.39±0.511 ^a	77.80±0.688 ^d
10,000 ppm	60.67±0.647 ^c	44.75±2.549 ^b	36.00±0.524 ^a	100.00±0.000 ^d
20,000 ppm	64.00±0.325 ^c	51.75±1.954 ^b	43.03±0.687 ^a	100.00±0.000 ^d

หมายเหตุ ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่มีตัวอักษรกำกับในแนวนอนต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ภาคผนวก ง

เทคนิคการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เทคนิคการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture medium) คือ ส่วนประกอบของสารอาหารที่เอื้ออำนวยให้จุลินทรีย์เจริญและแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปควรมีคุณสมบัติดังนี้

1. มีธาตุอาหารและความเข้มข้นที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์
2. มีความเป็นกรดและด่าง (pH) เหมาะสมกับการเจริญ
3. ปราศจากสารพิษที่มีผลต่อการเจริญ
4. ปราศจากสิ่งมีชีวิตชนิดใด ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื่อนั้น

อาหารเลี้ยงเชื้อสามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท

อาหารเลี้ยงเชื้อที่จำแนกตามองค์ประกอบของอาหาร

Complete medium หรือ Non – synthetic medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ทราบส่วนประกอบทางเคมีที่แน่นอนทั้งชนิดและปริมาณ อาหารเลี้ยงเชื่อนี้จะมีสารอินทรีย์มากมายที่ได้จากสารสกัดจากเนื้อเยื่อพืช หรือสัตว์ เช่น Peptone Yeast extract Beef extract หรือ Malt extract เป็นต้น อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จึงช่วยในการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ Nutrientbroth (NB) Nutrient agar (NA) Potato dextrose agar (PDA) หรือ Trypticase soy broth เป็นต้น

Chemically defined medium หรือ Synthetic medium เป็นอาหารสังเคราะห์ที่ทราบองค์ประกอบทางเคมีที่แน่นอน ดังนั้นในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้แต่ละครั้ง จะได้อาหารที่มีองค์ประกอบเหมือนกันทุกครั้ง เช่น Minimal medium ที่ประกอบด้วย กลูโคส 2.0 กรัม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 กรัม K_2HPO_4 0.7 กรัม MgSO_4 0.5 กรัม Agar 15.0 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

การกำจัดเชื้อ

วิธีการทำให้อาหารเลี้ยงปราศจากสิ่งมีชีวิตใด ๆ สามารถทำได้โดย

1. การใช้สารเคมี (chemical sterilization) ในการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อ มักใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ (disinfectant) เพื่อฆ่าเชือบนโต๊ะปฏิบัติการ โดยการเช็ดโต๊ะด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อก่อนและหลัง

ทำงาน การทำเช่นนี้จะช่วยควบคุมและลดโอกาสการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมบนโต๊ะในระหว่างการปฏิบัติการได้

2. การใช้ความร้อนชื้น (Moist heat) โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ในการกำจัดเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อและภาชนะที่บรรจุในห้องปฏิบัติการนิยมใช้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-30 นาที ขึ้นอยู่กับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งไอน้ำร้อนจะแทรกซึมเข้าสู่เซลล์และสปอร์ ทำให้โปรตีน (เอนไซม์) ต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์เสียสภาพทางชีววิทยา

3. การใช้ความร้อนแห้ง (dry heat) โดยใช้ตู้อบ (hot-air oven) กำจัดเชื้อในเครื่องแก้ว เครื่องมือเครื่องใช้ต่างๆ ที่เป็นวัสดุชนิดไม่เสื่อมสภาพได้ง่าย เช่น จานเพาะเชื้อ ปิเปต ขวด รวมถึงสารเคมีที่เป็นผงบางชนิดที่ทนความร้อนสูงได้ เช่น แป้ง การกำจัดเชื้อโดยวิธีการนี้ทำได้โดยอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เวลา 1 – 2 ชั่วโมง วิธีการนี้จะทำให้เกิดการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrate) และเกิดการ oxidation ของสารต่างๆ ภายใน protoplasm

4. การกรอง (filtration) โดยใช้เยื่อกรอง หรือแผ่นกรอง (membrane filtration) ที่ทำจาก cellulose acetate หรือ plastic polymer ที่มีความหนาเพียง 0.1 มิลลิเมตร ขนาดของรูเยื่อกรองตั้งแต่ 0.22 – 0.45 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าเซลล์จุลินทรีย์ วิธีการนี้นิยมใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ออกจากอาหารเหลว หรือของเหลวที่สลายตัวได้ง่าย เมื่อถูกความร้อน เช่น ยาปฏิชีวนะ ชีวรั่ว สารละลาย น้ำตาลบางชนิด การกำจัดเชื้อด้วยวิธีการนี้จุลินทรีย์ถูกแยกออกจากอาหารเหลว โดยเซลล์จุลินทรีย์จะติดอยู่บนเยื่อกรองอาหาร หรือของเหลวที่ผ่านการกรองแล้วจะปราศจากจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงต้องเก็บในภาชนะที่ผ่านการกำจัดเชื้อ

5. การเผาไฟ (Incineration) ในการเขี่ยเชือบนอาหารเลี้ยงเชื้ออาจใช้ Loop หรือ Needle การกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมาบน Loop หรือ Needle ก่อนและหลังจากการเขี่ยเชื้อสามารถทำได้ง่ายๆ โดยการเผาไฟจนร้อนแดง การใช้ Forceps ในการคีบจับวัสดุต่างๆ แบบปลอดเชื้อเช่น ใช้คีบจับ Disc ที่มียาปฏิชีวนะวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้จุ่ม Forceps ในแอลกอฮอล์แล้วฉีกไฟทันที ส่วนการกำจัดเชือบนแท่งแก้ว (Spreader) ซึ่งใช้สำหรับเกลี่ยเชือบนอาหารเพื่อให้เชื้อกระจายบนอาหารนั้นใช้วิธีเดียวกับ Forceps

วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ มีดังนี้

1. กล้องจุลทรรศน์ เป็นเครื่องมือที่สำคัญมากโดยเฉพาะ การศึกษารูปร่าง โครงสร้างและการเรียงตัวของเชื้อ
2. Petri dish จานอาหารเลี้ยงเชื้อมีฝาปิด อาจจะทำด้วยแก้วหรือพลาสติก มีพื้นที่ผิวของอาหารมากกว่าหลอดทดสอบ ปกติจะบรรจุอาหารลงในจานประมาณ 15 – 20 มิลลิลิตร
3. Inoculating Loop and Needle loop และ needle เป็นเครื่องมือที่ทำด้วยลวด ตัวนำความร้อนที่ดี เช่น Nichrom หรือ Platinum มีด้ามทำด้วยฉนวนความร้อน ลักษณะของ loop ตรงปลายเส้นลวดขดเป็นวงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มม. ส่วน needle นั้นปลายตรง การฆ่าเชื้อเครื่องมือทั้งสองชนิดใช้วิธี incineration คือการเผาไฟโดยตรง เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จากภาชนะหนึ่งไปใส่อีกในภาชนะหนึ่ง
4. Pipette เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายของเชื้อ หรือ สารเคมีจากภาชนะหนึ่งไปใส่อีกภาชนะหนึ่งในปริมาณที่แน่นอน ปิเปตมีหลายขนาดคือ 0.1 ml., 1 ml., 5 ml., 10 ml. หรือ 20 ml. เลือกใช้งานตามความเหมาะสม
5. Slide เป็นแผ่นแก้วสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาดประมาณ 2.5 x 7.5 cm. ใช้สำหรับเป็นที่รองรับเชื้อจุลินทรีย์ในการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ หรือ concave slide ชนิดที่มีหลุมตรงกลาง ใช้สำหรับ ดูการเคลื่อนไหวของจุลินทรีย์
6. Refrigerator ใช้สำหรับเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อหรือสารอื่นๆ ที่ต้องการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ เช่น ยาปฏิชีวนะ serum, plasma
7. Sterilizers เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับทำลายจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และ วัสดุ อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ
 - 7.1 Autoclave เป็นเครื่องมือที่ใช้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลาย และเครื่องมือแพทย์ เป็นการฆ่าเชื้อโดยความร้อนของไอน้ำ แสดงดังภาพผนวก 4



ภาพผนวก 4 เครื่องมือที่ใช้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

7.2 Hot air oven ใช้ฆ่าเชื้อในเครื่องแก้วต่างๆ เช่น Petri dish, pipette ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 1 ชม. 30 นาที แสดงดังภาพผนวก 5



ภาพผนวก 5 เครื่อง Hot air oven ใช้ฆ่าเชื้อในเครื่องแก้วต่างๆ

การเตรียมและการบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียม potato dextrose agar

สูตรอาหาร PDA

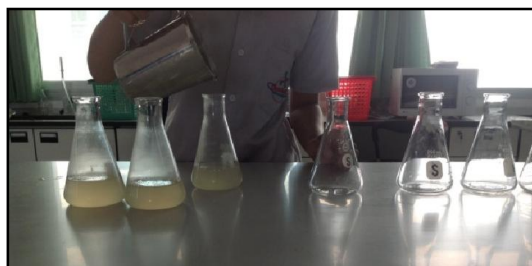
มันฝรั่ง	200	กรัม
เดกซ์โทรส	20	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียมมีดังนี้

1. ปอกเปลือกมันฝรั่ง หั่นเนื้อมันฝรั่งเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาดด้านละประมาณ 1 เซนติเมตร ซึ่งให้น้ำหนักตามสูตร แล้วต้มในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จนเดือดนานประมาณ 10 -15 นาที อย่าทำให้เนื้อมันฝรั่งและ กรองเอาแต่น้ำ
2. ชั่งน้ำตาลเดกซ์โทรส และวุ้นให้น้ำหนักตามสูตร ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนช่วยจนวุ้นละลายหมด
3. ผสมส่วนประกอบจากข้อ 1 และ ข้อ 2 เข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบตามสูตร (วิรุจน์, 2552)

การบรรจุอาหาร

- 1.บรรจุอาหารที่เตรียมเสร็จแล้วลงในหม้อกรอกอาหาร กรอกอาหารใส่ขวดและหลอดทดสอบ ระวังอย่าให้อาหารเปื้อนปากขวดหรือปากหลอด แสดงดังภาพผนวก 6



ภาพผนวก 6 การบรรจุอาหารลงขวดรูปชมพู่

2. ปิดขวดหรือหลอดอาหารด้วยการอุดด้วยจุกสำลีที่แน่นพอสมควร โดยนำสำลีที่ปริมาณเหมาะสมกับขนาดของหลอดทดสอบมาป้อนให้แน่นเป็นแท่งลักษณะทรงกระบอก ทดลองอุดและดึงจุกสำลีหลาย ๆ ครั้ง จุกสำลีที่ดีจะยังคงรูปอยู่เหมือนเดิม หลังจากบรรจุอาหารเรียบร้อยแล้ว รวบรวมขวดและหลอดอาหารใส่ตะกร้า ปิดหุ้มด้วยกระดาษหนา ๆ เพื่อป้องกันไอน้ำหยดลงมาทำให้สำลีเปียก นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเข้ากันดีแล้วไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนั่งด้วยหม้ออัดความดัน (autoclave) โดยใช้อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที (อนันต์, 2536; วันเพ็ญ, 2543; วิรุจน์, 2552; จินตนา และคณะ, 2555) แสดงดังภาพผนวก 7



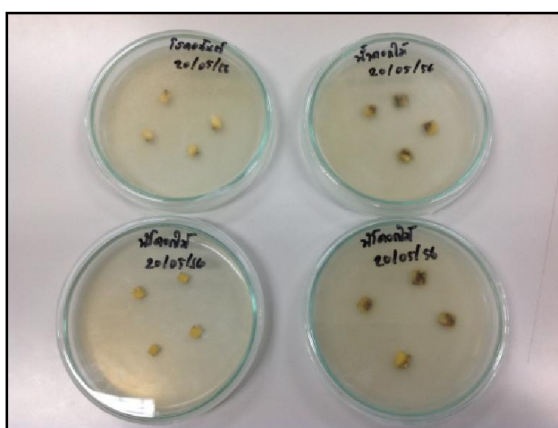
ภาพผนวก 7 การปิดจุกขวดบรรจุอาหาร และการนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนั่งด้วยหม้ออัดความดัน (autoclave)

3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นภายหลังการทำให้ปราศจากเชื้อเทใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฝาปิด (petri dish) (จินตนา และคณะ, 2555)

4. ทำความสะอาดภาชนะและเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารให้เรียบร้อย

การแยกเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนมะม่วง

ตัดชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรค ให้มีขนาด 1x1 เซนติเมตร แช่ด้วยน้ำยาคลอโรกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับน้ำ เชื้อ นำไปวางบนอาหาร water agar (WA) 3 วัน ตัดบริเวณปลายเส้นใยเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เพื่อแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ทำการเก็บเชื้อไว้ในอาหาร PDA เพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป แสดงดังภาพผนวก 8 (วิชัย และชัยณรงค์, 2548)



ภาพผนวก 8 การตัดชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรควางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

การทดสอบการเกิดโรคบนผลมะม่วง

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA 10 วัน ใช้ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร เพื่อตัดบริเวณขอบโคโลนี แล้วนำไปปลูกเชื้อบนผล และใบของมะม่วงน้ำดอกไม้ วางบนแผ่นที่ใช้เข็มเจาะ แล้วนำไปบ่มในกล่องให้ความชื้นเป็นเวลา 5 วัน วัดขนาดแผลที่เป็นโรค เพื่อคัดเลือก isolate ที่สามารถทำให้เกิดโรคได้รุนแรงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป แสดงดังภาพผนวก 9



ภาพผนวก 9 การทดสอบการเกิดโรคบนผลมะม่วง

การพิสูจน์โรคตามวิธีการ Koch's postulates

สำหรับเชื้อสาเหตุโรคพืชที่แยกได้บริสุทธิ์ และยังไม่ได้พิสูจน์ให้แน่ชัดว่าเป็นสาเหตุของโรคจริง จำเป็นต้องมีการพิสูจน์ให้แน่ชัดโดยอาศัยหลักการพิสูจน์โรคของ Koch (Koch's Postulates) ซึ่งมี 4 ข้อ ดังนี้ (ไพโรจน์, 2557)

1. ส่วนของพืชที่แสดงอาการของโรคและเกิดจากจุลินทรีย์ จะต้องพบจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุร่วมอยู่ในส่วนนั้นเสมอ (constant association)
2. เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคสามารถแยกนำไปเลี้ยงให้บริสุทธิ์ (isolation in pure culture) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือบนพืชปกติพันธุ์ที่เป็นโร่ง่าย ในกรณี que เชื้อโรคเป็นปรสิตแบบถาวร (obligate parasite)
3. นำเชื้อสาเหตุที่บริสุทธิ์นั้นไปปลูกบนพืชปกติที่เป็นชนิดและพันธุ์เดียวกับข้อ 2 ต้นพืชปกติจะต้องแสดงอาการของโรคให้เห็น

4. เชื้อที่เป็นสาเหตุสามารถแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์จากต้นพืชที่เป็นโรค จากผลการปฏิบัติในข้อ 3 ได้อีก แล้วนำไปปลูกบนต้นปกติใหม่ ต้นพืชปกตินั้นจะแสดงอาการของโรคให้เห็นอีกเหมือนในข้อ 3 (re-isolation and re-inoculation)

หากเป็นจริงตามวิธีการดังกล่าวแล้ว เชื้อที่แยกได้นั้นจึงจะเป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค การพิสูจน์โรคตามวิธีดังกล่าว อาจมีการแตกต่างไปบ้างในรายละเอียด เนื่องจากธรรมชาติของโรคและคุณสมบัติของเชื้อที่เป็นสาเหตุแตกต่างไปจากโรคและเชื้อที่เป็นสาเหตุอื่นๆ

ภาคผนวก จ

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

๒๐ - ๒๑

นางสาวนฤมล เสียงเล็ก

วัน เดือน ปี เกิด

29 พฤษภาคม 2532

การศึกษา

พ.ศ. 2549 มัชฌมปัลลย แผนกวิทยาศาสตร์ – คณิตศาสตร์

โรงเรียนสตรีชัยภูมิ อ.เมือง จ.ชัยภูมิ

พ.ศ. 2554 ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่

ผลงานการวิจัย

Sianglek N., Junthip R., and Chimsook T. “The Phenolic compounds and antioxidant activity of ethanolic extract of *Mimosa Pudica*”

Linn. and *phyllanthus niruri* Linn. น.244 งานประชุมวิชาการ

Pure and Applied Chemistry International Conference 2013

(PACCON 2013) ภาคโปสเตอร์. ชลบุรี : มหาวิทยาลัยบูรพา

Narumon S., Uthumporn K. and Thitiphan C. 2013. "Evaluation of crude extracts of MIMOSA PUDICA LINN. against

Colletotrichum gloeosporioides to control Anthracnose” **Advanced Materials Research.** 699 : p 703-707.