

บทที่ 2

วิธีการทดลองและผลการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ : เกรดธรรมดา

สารเคมี	บริษัท
1. เมทานอล	BDH Limited Poole England
2. เอทานอล 70% , เอทานอล 95%	โรงงานสุราอยุธยา ประเทศไทย
3. ไคคลอโรมีเทน	BDH Limited Poole England
4. เอธิลอะซีเตต	BDH Limited Poole England
5. เฮกเซน	CARLO ERBA
6. ซิลิกาเจล (สำหรับโครมาโตกราฟีผิวบาง)	E - Merk เยอรมันนี
7. ซิลิกาเจล (สำหรับคอลัมน์โครมาโตกราฟี)	E - Merk เยอรมันนี
8. โซเดียมซัลเฟต	CARLO ERBA
9. อะซีโตน	CARLO ERBA
10. ผงวุ้น	ตราโทรศัพท์
11. กลูโคส (Glucose - D)	Boot Manufacturing ประเทศไทย

วัสดุและอุปกรณ์

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดแยกสารสกัด และ หาสูตรโครงสร้างของสารต้านเชื้อราจากผิวมะม่วง	บริษัท
1. เครื่องปั่นไฟฟ้า	NATIONAL
2. เครื่องระเหยสาร (rotatory evaporator)	BUCHI
3. แผ่นแก้วขนาด 20 × 20 ซม. และ 5 × 20 ซม.	-
4. ไมโครปิเปต	BIOHIT
5. tankiแก้ว ขนาด 20 × 5 × 20 ซม.	-
6. ฐานเคลือบพลาสติก	CORNING
7. IR spectrometer	JUSCO U.S.A.
8. Gas Chromatography	SHIMADSU JAPAN
9. Gas Chromatography - Mass spectrometer	SHIMADSU JAPAN
10. ¹ H-NMR spectrometer	SHIMADSU JAPAN
11. Analytical balance	SARTORIUS

ผิวมะม่วงทดลอง

ผิวมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ จาก ตลาดร่มสั๊ก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ช่วงเดือน กรกฎาคม
กันยายน 2538 และจาก ไร่ประพัฒน์ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ ช่วงเดือน มีนาคม - มิถุนายน
2539

ผิวมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ แรด และทองคำ จากไร่ประพัฒน์ อ.สันทราย จ.
เชียงใหม่ ช่วงเดือน มีนาคม - พฤษภาคม 2539



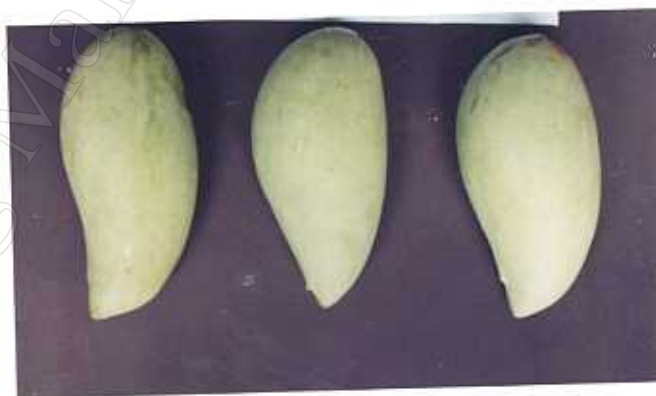
A



B



C



D

รูปที่ 2 ลักษณะของผลมะม่วงที่ใช้ในการทดลอง

A = มะม่วงพันธุ์โชคอนันต์

B = มะม่วงพันธุ์แรด

C = มะม่วงพันธุ์ทองคำ

D = มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

วิธีการทดลอง

การทดลองที่1 การสกัดสารและแยกสารที่มี Rf อยู่ในช่วง 0.10 - 0.30 โดยวิธี
Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) และ
Column Chromatography (CC)

1.1 การสกัดสาร

1.1.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) จากผิวมะม่วง

ปอกเปลือกมะม่วงหนาประมาณ 2 - 3 มม. ล้างให้สะอาดเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากยางมะม่วงและสิ่งสกปรกอื่นๆเลือกเอาเปลือกที่มีลักษณะเป็นจุดดำๆออก ผึ่งลมให้น้ำแห้งประมาณ 10 นาที นำไปหั่นแล้วชั่งเพื่อหาปริมาณที่แน่นอนของน้ำหนักเปลือกสดที่ได้ แล้วบั่นในเครื่องปั่นความเร็วสูงประมาณ 2 นาที พร้อมกับเติมเอธานอล95% ที่เย็นลงไปเล็กน้อย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปั่น จากนั้นนำมาแช่เอธานอล95% ประมาณ 1 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนของ เปลือกมะม่วง ต่อ เอธานอล95% ประมาณ 50 กรัม ต่อ 150 มล. กรองเอากากออกโดยใช้ผ้าขาวบาง กากที่ได้นำไปสกัดด้วยเอธานอล95% อีกครั้ง นำสารละลายที่ได้มากรองเอาตะกอนออกโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วนำไประเหยเอาเอธานอลออกให้เหลือ 1 ใน 3 ส่วนโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้ความดันต่ำ (rotatory evaporator) และใช้อุณหภูมิที่ water bath 50 °C นำสารละลายที่ได้มาใส่ในกรวยแยก ทิ้งไว้สักครู่แล้วจึงเติมไดคลอโรมีเทนปริมาตรเท่ากับสารละลายที่ได้ เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ไขเอาชั้นของไดคลอโรมีเทนซึ่งอยู่ชั้นล่างออก ส่วนที่เหลือเติมไดคลอโรมีเทนเขย่าให้เข้ากันและแยกเอาสารละลายที่อยู่ในชั้นของไดคลอโรมีเทนออก และนำไปรวมกับครั้งแรก กำจัดน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟต กรองเอาโซเดียมซัลเฟตออก แล้วนำไประเหยเอาไดคลอโรมีเทนออกจนแห้งละลายส่วนสกัดหยาบที่ได้ด้วยไดคลอโรมีเทนเล็กน้อย แล้วนำไปเก็บในขวดใส่สารตัวอย่างปล่อยให้ไดคลอโรมีเทนระเหยจนแห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักบันทึกปริมาณของส่วนสกัดหยาบที่ได้นำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ-4°C

ผลการสกัดสาร แสดงโดยตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการสกัดสาร

พันธุ์มะม่วง	ช่วงอายุ (เดือน)	นน เปลือกสด (กรัม)	นน crude (กรัม)	%yieldของ crudeจากนน เปลือกสด
โชคอนันต์	2	100	0.2243	0.20
	3	100	0.2103	0.20
	4	100	0.2230	0.20
	สุก	100	0.2320	0.20
แรด	2	100	0.2297	0.20
	3	100	0.2030	0.20
	4	100	0.2005	0.20
ทองคำ	2	100	0.2015	0.20
	3	100	0.2296	0.20
	4	100	0.2122	0.20
น้ำดอกไม้	2	100	0.2253	0.20
	3	100	0.2230	0.20
	4	100	0.2191	0.20

1.2 การทำ Column Chromatography (CC)

ล้างคอลัมน์ขนาด 40 ซม เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ซม ทิ้งไว้ให้แห้ง นำสำลีจำนวนเล็กน้อยอุดบริเวณคอ คอลัมน์ เพื่อกรองซิลิกาเจล จากนั้นชั่งซิลิกาเจล (สำหรับคอลัมน์) 80 กรัม ละลายในเฮกเซน ใช้แท่งแก้วคนจนกระทั่งไม่มีฟองอากาศเหลืออยู่ จากนั้นเทส่วนผสมที่ได้ลงในคอลัมน์อย่างรวดเร็ว ระวังอย่าให้ซิลิกาเจลแห้ง ปิดคอลัมน์ทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้ซิลิกาเจลเรียงตัวกันแน่นขึ้น จากนั้นชั่ง crude extract ที่ได้จากข้อ 1.1 มา 1.0000 กรัม ละลายในเฮกเซนเล็กน้อย ใช้ฟาสเจอร์บีเปิดดูดสารใส่ในคอลัมน์ จากนั้นใช้สำลีทำเป็นแผ่นบางๆ ขนาดเท่าเส้นรอบวงของคอลัมน์ ใส่ลงในคอลัมน์ เริ่มใช้ตัวทำละลายชะสาร โดยเริ่มจาก ตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ในที่นี้ใช้ เฮกเซน จากนั้นเริ่มเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความเป็นขั้วโดยใช้ เอธิลอะซิเตต โดยค่อยๆ เพิ่มเปอร์เซ็นต์ของเอธิลอะซิเตต ตั้งแต่ 15 20 25 50 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเริ่มเพิ่มความเป็นขั้วอีก โดยเติม เมทานอล เริ่มที่ 5 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ละขั้นต้องชะจนสารละลายไหลจึงเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความเป็นขั้วลงไป นำสารละลายแต่ละ fraction ที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ดูว่ามี fraction ใดบ้างที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราชนิดนี้ได้ และ มี Rf อยู่ในช่วง 0.10 - 0.30

ผลการแยกสารที่มี Rf อยู่ในช่วง 0.10 - 0.30 โดยวิธี Column Chromatography

ความยาวของคอลัมน์ 40 ซม เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ซม

ซิลิกาเจล (สำหรับคอลัมน์) 80 กรัม

ส่วนสกัดหยาบ(crude extract) จากมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ 1.0073 กรัม

ตารางที่ 4 ผลการแยกสารที่มี Rf อยู่ในช่วง 0.10 - 0.30 โดยใช้วิธี ColumnChromatography

fraction	ตัวทำละลายที่ใช้ n-Hexane : EtOAc : MeOH	สีของสารละลายที่เกิดขึ้น	ปริมาตร ของตัวทำละลาย ใช้ (mL)	Rf จาก I ₂ test (ชม.)	ผลการ ทดสอบโดย วิธี
1.	100 : 0 : 0	เหลือง	1,000	0.83	ไม่มี
2.	85 : 15 : 0	เหลืองเข้ม	750	0.63,0.97	ไม่มี
3.	80 : 20 : 0	เหลือง น้ำตาล เหลือง	750 250 300	0.03-0.07 0.82-0.93 0.39 -	ไม่มี ไม่มี ไม่มี
4.	75 : 25 : 0	เหลือง	700	0.03,0.19, 0.72,0.81, 0.91	ไม่มี
5.	50 : 50 : 0	เหลืองอ่อน น้ำตาลเข้ม เหลืองน้ำตาล เหลืองอ่อน	200 150 200 1,500	0.63 0.77-0.81 0.87-0.93 0.03-0.07	ไม่มี ไม่มี ไม่มี มี

ตารางที่ 4 (ต่อ)

fraction	ตัวทำละลายที่ ใช้ n-Hexane : EtOAc : MeOH	สีของสาร ละลายที่ เก็บได้	ปริมาตร ของตัวทำ ละลายที่ ใช้จะ (ml)	Rf จาก I ₂ test (ขั้ว)	ผลการ ทดสอบ โดย ชีววิธี
6.	25 : 75 : 0	เหลือง	1,000	0.03-0.07 0.63,0.76, 0.81, 0.87-0.93	ไม่มี
7.	0 : 100 : 0	เหลือง	1,200	0.75-0.79	ไม่มี
8.	0 : 90 : 10	เหลือง	600	-	ไม่มี

นำสารละลายที่มีตัวทำละลายเป็น n-Hexane : EtOAc : MeOH (50 : 50 : 0) v/v ปริมาตร 1,500 มล. ไประเหยเอาตัวทำละลายออก จะได้สารที่มีลักษณะเป็นยางเหนียวสีน้ำตาลเข้ม นำสารที่ได้ไปละลายในไดคลอโรมีเทนเล็กน้อย ใช้พาสเจอร์ปีเปต ดูดสารละลายที่ได้เก็บใส่ขวดตัวอย่าง ได้สารที่คาดว่าเป็สารที่มี Rf อยู่ในช่วง 0.10 - 0.30 ประมาณ 0.0710 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ yield จากน้ำหนัก crude 1.0073 กรัม ได้เท่ากับ 7.049 %

1.3 การทำ Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC)

1.3.1 การเตรียม TLC เพลต สำหรับแยกสาร

ล้างเพลตขนาด 5×20 ซม และ / หรือ ขนาด 20×20 ซม ให้สะอาดด้วยน้ำ ผึ่งให้แห้ง นำมาวางบนฐานเคลือบเพลต เช็ดเพลตด้วยอะซิโตนอีกครั้ง เพื่อให้หมดคราบไขมัน และคราบสกปรกอื่นๆ จากนั้นลือคฐานเคลือบเพลตให้แน่น ชั่งซิลิกาเจล (สำหรับ TLC) 70 กรัม ผสมน้ำกลั่น 140 มล หรือในอัตราส่วน 1 : 2 โดยประมาณ เขย่าส่วนผสมทั้งหมดให้เป็นเนื้อเดียวกันในขวดรูปชมพู่ที่มีจุกยางปิดสนิท ทำเป็น suspension ถ้ายังหนืดเติมน้ำลงไปเล็กน้อย เทส่วนผสมที่ได้ลงภาชนะที่ใส่ applicator จากนั้นเลื่อนภาชนะให้ suspension ไหลลงบนเพลต จากนั้นรอให้ suspension แห้งพอสมควร นำใส่ชั้น rack แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ประมาณ 3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่ จึงนำมาใช้งาน ความหนาของการเคลือบเพลตเท่ากับ 1.0 มม

1.3.2 การเตรียมตัวทำละลายเคลื่อนที่ (developing solvent)

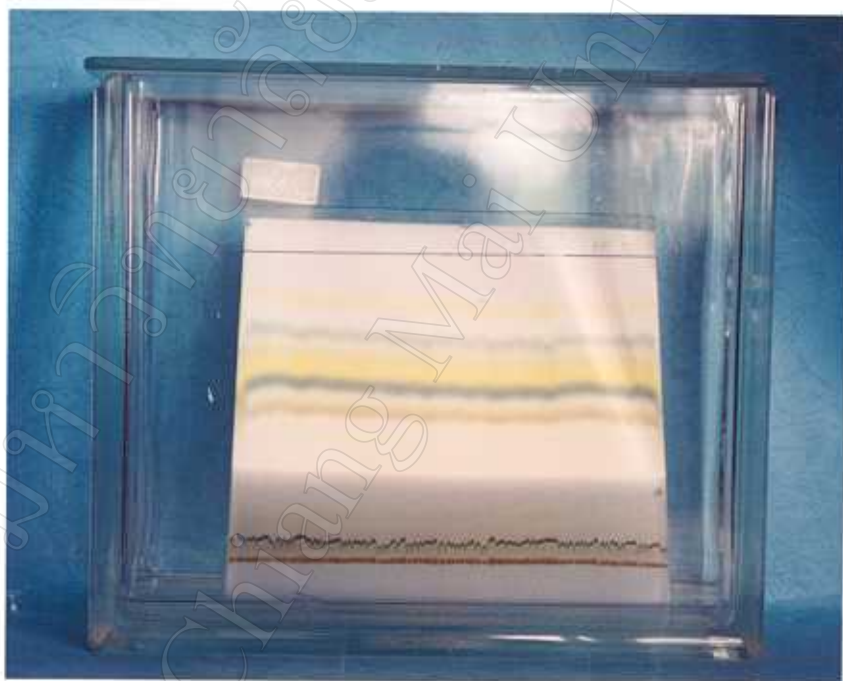
ตัวทำละลายเคลื่อนที่ ที่ใช้คือ n-hexane : EtOAc : MeOH เท่ากับ 60 : 40 : 1

1.3.3 การเตรียม tank สำหรับ PTLC

นำตัวทำละลายเคลื่อนที่ ที่เตรียมไว้ใส่ลงใน tank ที่มีขนาด $20 \times 5 \times 20$ ซม โดยที่ให้ความสูงของตัวทำละลายประมาณ 1.5 ซม ใส่กระดาษกรอง Whatman No.1 2 แผ่นไว้ด้านข้าง เพื่อให้ไอสารอ้อมตัว ปิดฝาทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงให้ไออ้อมตัวทั่วทั้ง tank

1.3.4 การใส่ สารสกัดหยาบ(crude extract) ลงบน PTLC เพลต

ซึ่งสารสกัดหยาบที่เตรียมได้ประมาณ 0.2000 กรัม ละลายด้วยไคลคลอโรมีเทนเล็กน้อย ใช้คาปิลลารีหยดสารลงบนเพลตที่เตรียมได้จากข้อ 1.3.1 โดยใช้เพลตขนาด 20×20 ซม (ได้ประมาณ 9 - 10 เพลต) หยดสารละลายที่ได้ให้ห่างจากขอบล่าง 2.5 ซม เป็นแนวนัด ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยไปจนหมด นำเพลตที่ได้ใส่ลงใน tank ที่เตรียมได้จากข้อ 1.3.3 เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึง solvent front ซึ่งมีระยะห่างจากจุดที่หยดสาร 15 ซม นำเพลตออกจาก tank ทิ้งไว้ในตู้ดูดควันประมาณครึ่งชั่วโมง โดยโครมาโตแกรมที่ได้แสดงดังในรูปที่ 3 4 5 6 และ 7



รูปที่ 3 แสดงลักษณะการแยกของสารสกัดหยาบบน PTLC เพลต



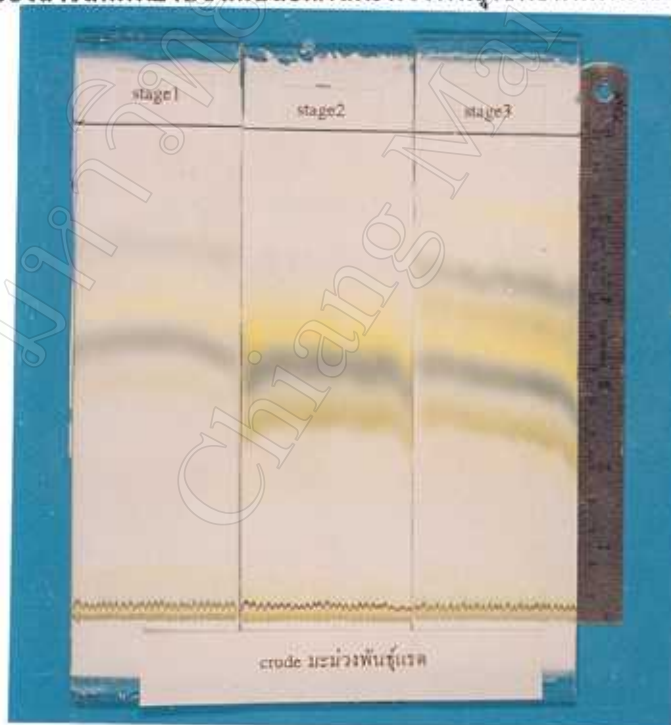
รูปที่ 4 แถบสีของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลมะม่วงพันธุ์ทองดำในระยะต่างๆ บน PTLC เพลต



รูปที่ 5 แถบสีของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ในระยะต่างๆ บน PTLC เพลต



รูปที่ 6 แถบสีของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลมะม่วงพินธุ์ขอนแก่นในระยะต่างๆ บน PTLC เพลต



stage1 = 2 เดือน

stage2 = 3 เดือน

stage3 = 4 เดือน

stage4 = ดอก (12 วัน

หลังเก็บเกี่ยว

รูปที่ 7 แถบสีของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลมะม่วงพินธุ์เรดในระยะต่างๆ บน PTLC เพลต

จุดแถบสารที่มี Rf อยู่ในช่วง 0.10 - 0.30 มารวมกันแล้วสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน : เมธานอล ในอัตราส่วน 1: 1 กรองเอาซิลิกาเจลออก จากนั้นกำจัดน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟตแล้วกรองเอาโซเดียมซัลเฟตออก นำไประเหยเอาตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่อง rotatory evaporator ที่อุณหภูมิของ water bath 50 °C จนแห้ง จากนั้นละลายด้วยไดคลอโรมีเทนเล็กน้อย แล้วถ่ายใส่ขวดใส่สาร บันทึกน้ำหนักของสารได้ 0.0993 กรัม คิดเป็น % yield จากน้ำหนัก crude 0.2007 กรัม ได้เท่ากับ 49.48 %

การทดลองที่ 2 การตรวจหาสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* โดยวิธี PTLC - Bioassay

2.1 การเตรียมกลองบ่มเชื้อ

นำกลองพลาสติก กว้าง 15 ซม ยาว 25 ซม สูง 12 ซม มาล้างน้ำแล้วผึ่งลมให้แห้ง เช็ดด้วย เอทานอล 70% อีกครั้งเพื่อฆ่าเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้กลองแห้ง จากนั้นนูนด้านล่างของกลอง และด้านในของฝาปิดทึบ Шу สเปรย์ด้วยน้ำกลั่นให้ชุ่ม ปิดฝาทิ้งทิ้งไว้ให้เป็น กลองบ่มเชื้อ

2.2 การเตรียมอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides*

2.2.1 Potato Dextrose Agar (PDA)

ส่วนประกอบ	มันฝรั่ง	200	กรัม
	น้ำตาล dextrose	20	กรัม
	ผงวุ้น	15	กรัม
	น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปอกเปลือกมันฝรั่งขังให้ได้ 200 กรัม ล้างด้วยน้ำสะอาดแล้วหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กๆ ขนาดเท่าลูกเต๋า นำไปต้มในน้ำกลั่น 500 มล จนกระทั่งเนื้อมันฝรั่งสุก สังเกตโดยใช้นิ้วมือบีบจะนิ่มแต่ไม่เละ จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง น้ำที่เหลือ 500 มล ละลายผงวุ้นกับน้ำตาล dextrose เข้าด้วยกัน ต้มพอเดือด ผสมน้ำต้มมันฝรั่งกับน้ำต้มผงวุ้นและน้ำตาล คนให้เข้ากัน ในขณะที่ต้มมันฝรั่งและผงวุ้นกับน้ำตาลนั้นมือน้ำบางส่วนระเหยไป เพราะฉะนั้นต้องเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 1,000 มล แล้วนำไปบรรจุขวด ขวดละ 200 มล ปิดจุกขวดด้วยจุกสำลี ใช้กระดาษปิดจุกสำลีและใช้ยางวงรัดจุกขวด จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C นาน 20 นาที

2.2.2 Potato Dextrose Broth (PDB)

ส่วนประกอบ	มันฝรั่ง	200	กรัม
	น้ำตาล dextrose	20	กรัม
	น้ำกลั่น	1,000	กรัม

ปอกเปลือกมันฝรั่งหั่นให้ได้ 200 กรัม ล้างด้วยน้ำสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดเท่าลูกเต๋า นำไปต้มในน้ำกลั่น 1,000 มล ต้มจนกระทั่งเนื้อมันฝรั่งสุก จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง ใส่น้ำตาล dextrose ลงไปในน้ำต้มมันฝรั่ง 20 กรัม คนให้เข้ากันเติมน้ำให้ครบ 1,000 มล แล้วนำไปบรรจุขวด ขวดละ 200 มล ปิดจุกขวดด้วยจุกสำลี และใช้กระดาษขาวปิดทับจุกสำลี ใช้อย่างระวังจุกขวดอีกครั้ง หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 °C นาน 20 นาที

2.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* บนจานอาหาร (PDA)

หลอมอาหาร PDA ด้วยเตาไมโครเวฟ เมื่อละลายดีแล้วตั้งรอให้อาหารอุ่นตัวนำไปเทลงในจานเพาะเชื้อ จานละประมาณ 15 - 20 มล แล้วตั้งทิ้งไว้ให้อาหารในจานเย็นตัวลงจนแข็ง จากนั้นใช้ลูปแตะสปอร์ของเชื้อรา *C. cladosporioides* จากที่เก็บไว้ใน PDA slant หรืออาจได้จากที่เก็บไว้ในจานเพาะเชื้อก็ได้ ทำการ streak ลงบนจานเพาะเชื้อใหม่ การ streak plate ในจานเพาะเชื้อนั้นให้ทำแบบเต็มที คือ ทำรอย streak ลงบนผิวหน้าอาหารในจานเพาะเชื้อ ซ้ำๆ กัน 5 ครั้ง จากนั้นนำไปเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง ประมาณ 5 - 7 วัน (ให้แสงสลัวมืด)

2.4 การเตรียม spore suspension ของเชื้อรา *C. cladosporioides*

เทน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในจานเพาะเชื้อรา ประมาณ 10 มล จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลเกลี่ยให้เส้นใยและสปอร์ของเชื้อราหลุดจากผิวหน้าอาหาร นำไปกรองบนผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อกรองเอาเศษขุ่นและเส้นใยของเชื้อราออก จากนั้นหยด tween 20 ลงไปใน spore suspension ประมาณ 0.004 มล. เพื่อให้สปอร์ของเชื้อรากระจายได้ดีขึ้น จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง shaker แล้วใช้ลูปที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงใน spore suspension นำ spore suspension ที่ติดอยู่ที่ลูปแตะลงบนขอบของ cover glass ซึ่งปิดทับอยู่บน scale ของ Haemocytometer โดยจุ่มแตะทั้ง 2 ด้าน จากนั้นทำการตรวจนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราได้

ที่ติดอยู่ที่ลูปและลงบนขอบของ cover glass ซึ่งปิดทับอยู่บน scale ของ Haemocytometer โดยจุ่มและทิ้ง 2 ด้าน จากนั้นทำการตรวจนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราได้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope ปรับความเข้มข้นของสารละลายแขวนลอยจนได้สปอร์เข้มข้น 1×10^6 สปอร์/มล โดยเชื้อรา *C. cladosporioides* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน แสดงดังในรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงเชื้อรา *C. cladosporioides* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน

2.5 การพ่นเชื้อรา *C. cladosporioides* ลงบน PTLC เพลด (PTLC - Bioassay)

นำ spray gun มาล้างด้วยเอทานอล 70% ประมาณ 30 มล จากนั้นนำ PTLC เพลดที่ได้จากข้อ 1.3.4 มาวางลงบนกระดาษที่รองไว้ในตู้ดูดควัน ทำการพ่นเชื้อให้ทั่วแผ่น พอหมาดๆ จากนั้นนำใส่กล่องบ่มเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 คืน บันทึก Rf ของแต่ละแถบที่เกิด inhibition area (แถบที่สนใจคือแถบที่มี Rf อยู่ในช่วง 0.10 - 0.30) ดังในรูปที่ 9



รูปที่ 9

แถบสารที่ด้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. cladosporioides* ที่มี Rf อยู่ในช่วง 0.10 - 0.30 ในเมฆางสายพันธุ์โซคอนันต์

การทดลองที่ 3 การทำ calibration curve

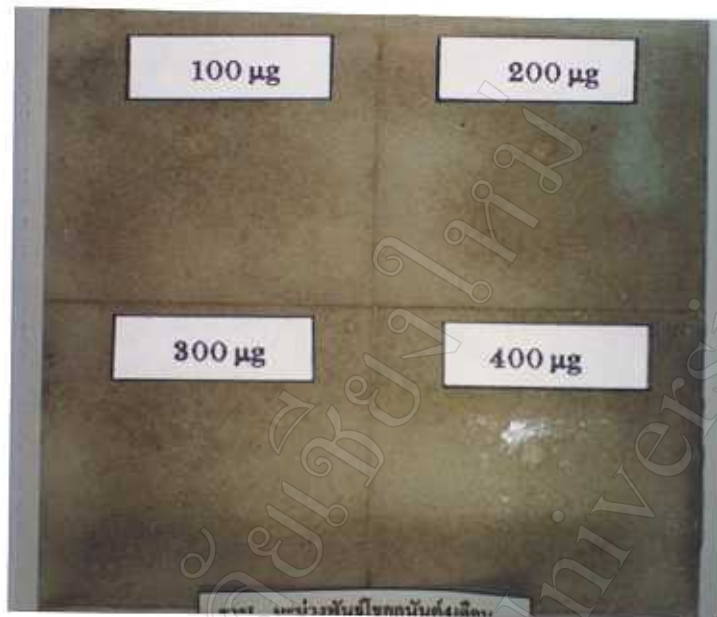
ชั่งน้ำหนักเปลือกสด 100 กรัม ของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ที่มีอายุ 4 เดือน มาบดละเอียดและสกัดตามข้อ 1.1 ได้ส่วนสกัดหยาบ 0.2009 กรัม ละลายสารสกัดหยาบด้วยไคลลอรอมีเทนเล็กน้อย จากนั้น spot ลงบน TLC เพลต ตามข้อ 1.3.4 แล้วนำไป spray เชื้อรา ขูดแถบที่มี R_f 0.10 - 0.30 มารวมกัน และสกัดด้วยไคลลอรอมีเทนกับเมธานอล ในอัตราส่วน 1 : 1 กรองเอาซิลิกาเจลออก ตรวจสอบว่าสารที่อยู่ในซิลิกาเจลถูกชะออกมาหมดหรือยัง โดยการหยดสารละลายที่กรองได้ลงใน TLC เพลต ทิ้งไว้ให้แห้งสักครู่แล้วนำไปลงใน tank ที่มีไอของไอโอดีน ถ้ามีการ absorb ไอของไอโอดีนแสดงว่าสารยังถูกชะออกมาไม่หมด (เพราะสารอินทรีย์ทุกชนิดจะ absorb ไอของไอโอดีน) จากนั้นกำจัดน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟต แล้วกรองเอาโซเดียมซัลเฟตออกนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่อง rotatory evaporator ที่อุณหภูมิของ water bath 50 °C จนแห้ง ถ่ายสารที่ได้ลงในขวดตัวอย่างโดยละลายด้วยไคลลอรอมีเทนเล็กน้อย จากนั้นนำสารที่ได้ spot ลงบน TLC เพลต แล้วนำไป spray เชื้อราอีกครั้ง ขูดแถบสารที่มี R_f 0.10 -0.30 (ดูรูปที่ 10) มารวมกันแล้วทำตามวิธีข้างต้น จะได้สารที่มี R_f 0.10 -0.30 ที่มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง เรียกสารนี้ว่า สาร(I) ได้สาร (I) 0.1008 กรัม นำสาร(I) ที่ได้มาทำ calibration curve โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 0 , 100 , 200 , 300 , 400 , 500 , 1,000 , 2,000 , 3,000 , 4,000 , 5,000 , 10,000 , 15,000 และ 20,000 $\mu\text{g/ml}$ นำสารละลายที่ได้มา 100 μl spot ลงบน TLC เพลต จะได้ปริมาณสาร (I) เท่ากับ 0 , 10 , 20 , 30 , 40 , 50 , 100 , 200 , 300 , 400 , 500 , 1,000 , 1,500 และ 2,000 μg บน PTLC เพลต โดยทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น ทิ้งไว้จนตัวทำละลายระเหยหมดแล้วนำไปทดสอบกับเชื้อ *C. cladosporioides* ตามข้อ 2.5 เพื่อหา inhibition area โดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition area ที่ได้แต่ละจุด ดังแสดงในรูปที่ 11 12 และ 13 จากนั้นนำค่าที่ได้มาบันทึกผล ดังแสดงในตารางที่ 5 และนำผลที่ได้ไป plot กราฟระหว่างขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition area (mm) กับน้ำหนักของสาร (μg) ดังกราฟรูปที่ 14



รูปที่ 10 การทำ PTLC - Bioassay 2 ครั้ง



รูปที่ 11 การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. cladosporioides* เมื่อใช้ปริมาณสาร (I) 20 , 30, 40 และ 50 µg ไม่พบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา



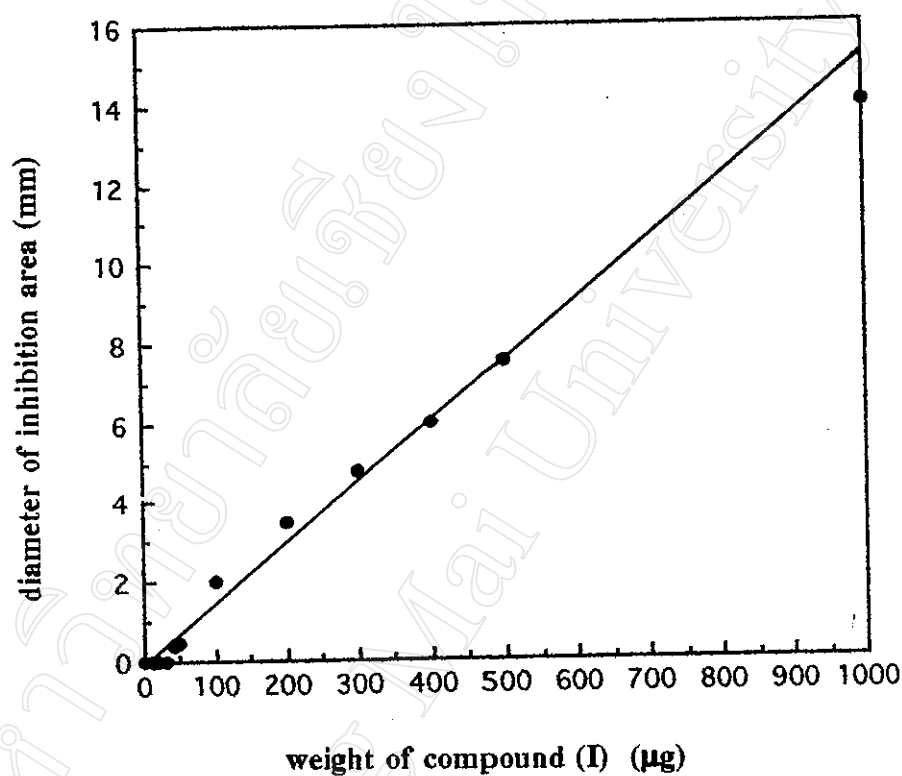
รูปที่ 12 การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. cladosporioides* เมื่อใช้ปริมาณสาร (I) 100 , 200, 300 และ 400 µg ปรากฏบริเวณยับยั้งรอบจุดที่หยดสาร



รูปที่ 13 การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. cladosporioides* เมื่อใช้ปริมาณสาร (I) 500 , 1,000, 1,500 และ 2,000 µg ปรากฏบริเวณยับยั้งรอบจุดที่หยดสาร

ตารางที่ 5 ความสามารถของสาร (I) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. cladosporioides* ของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์อายุ 4 เดือนที่ความเข้มข้นต่างๆกัน

ความเข้มข้นของ สาร (I) ($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาณของสาร (I) บน PTLC เพลต (μg)	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง ของบริเวณที่ยับยั้งการเจริญ ของเชื้อ (mm)
0	0	-
100	10	-
200	20	-
300	30	-
400	40	0.4
500	50	0.5
1,000	100	2.0
2,000	200	3.5
3,000	300	4.8
4,000	400	6.0
5,000	500	7.5
10,000	1,000	14.0
15,000	1,500	18.5
20,000	2,000	20.0



รูปที่ 14

calibration curve ของสาร (I)

สมการพยากรณ์ $y = 0.24570 + (1.4088 \times 10^{-2} x)$

y = diameter of inhibition area (mm)

x = weight of compound (I) (μg)

diameter of inhibition area (mm) มีความสัมพันธ์กับ weight of compound (I) สูง ในทางบวก ซึ่งมีค่าสหสัมพันธ์ (r) = 0.994

การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบปริมาณสาร (I) ในมะม่วง ทั้ง 4 สายพันธุ์

นำเปลือกสด 100 กรัม มาบดละเอียดและสกัดตามข้อ 1.1 ได้สารสกัดหยาบ 0.2000 กรัม นำสารสกัดหยาบที่ได้มาแยกโดย TLC 1 ครั้ง จุดแถบที่มี Rf ในช่วง 0.10 - 0.30 มารวมกัน (โดยไม่ spray เชื้อรา) ได้สาร (I*) ประมาณ 0.1000 กรัม นำสาร (I*) มาละลายในไคคลอโรมีเทนให้ได้ความเข้มข้น 10,000 $\mu\text{g/ml}$ โดยชั่งสาร(I*) 0.0010 กรัม ละลายในไคคลอโรมีเทน 1 มล นำสารละลายที่ได้ทั้งหมดมา spot ลงบน TLC เพลต จากนั้นนำมา spray หา inhibition area ดังแสดงในรูปที่ 14 15 และ 16 จากนั้นใช้ calibration curve เทียบหาน้ำหนักของสาร (I) ได้ และสามารถคำนวณหาน้ำหนักของสาร (I) ในเปลือกสด 1 กรัมได้ดังต่อไปนี้

การคำนวณหาปริมาณของสาร (I) จากน้ำหนักเปลือกสด

นำสาร(I*) 0.0010 g ละลายในไคคลอโรมีเทน 1 ml นำสารละลายที่ได้ทั้งหมด spot ลงบน TLC เพลต จากนั้นนำมา spray เชื้อราแล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition area ได้เท่ากับ A mm นำมาเทียบกับสมการของ calibration curve จะทราบว่า มีสาร (I) เท่ากับ B μg

สาร (I*)	C	g	มาจากเปลือกสด	100	g
สาร (I*)	0.0010	g	มาจากเปลือกสด	$(100 \times 0.0010) / C$	g
สาร (I)	B	μg	มาจากเปลือกสด	$(100 \times 0.0010) / C$	g

$\therefore$ ถ้าน้ำหนักเปลือกสด 1 g จะมีสาร (I) $BC / 0.1$ μg

หมายเหตุ

- A = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition area (mm.) (จากตารางที่ 7)
 B = ปริมาณสาร (I) μg เทียบจากสมการของ calibration curve (จากตารางที่ 7)
 C = ปริมาณสาร (I*) g (จากตารางที่ 6)
 สาร (I*) = สาร (I) ที่ไม่บริสุทธิ์

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณของสาร (I) จากน้ำหนักเปลือกสดในมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์
อายุ 2 เดือน

นำสาร(I*) 0.0010 g ละลายในไดคลอโรมีเทน 1 ml นำสารละลายที่ได้ทั้งหมดมา spot ลงบน TLC
เพลต จากนั้นนำมา spray เขีอรแล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition area ได้เท่ากับ 11 mm นำมาเทียบกับ
สมการของ calibration curve จะทราบว่า มีสาร (I) เท่ากับ 763.37 μg

สาร (I*)	0.1008	g	มาจากเปลือกสด	100	g
สาร (I*)	0.0010	g	มาจากเปลือกสด	$(100 \times 0.0010) / 0.1008$	g
สาร (I)	763.37	μg	มาจากเปลือกสด	$(100 \times 0.0010) / 0.1008$	g

$$\therefore \text{ถ้าน้ำหนักเปลือกสด 1 g จะมีสาร (I) } (763.37 \times 0.1008) / 0.1 \quad \mu\text{g}$$

$$= 769.48 \quad \mu\text{g}$$

ผลการคำนวณหาปริมาณสาร (I) จากน้ำหนักเปลือกสด 1 g แสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์ของสาร (I*) จากน้ำหนักเปลือกสดที่ได้จากการทำ PTLC 1 ครั้ง
(โดยไม่ spray เชื้อรา)

พันธุ์มะม่วง	ช่วงอายุ (เดือน)	นน เปลือก สด (กรัม)	นน สารสกัด หยาบ (กรัม)	% ของสาร (I*) ที่ได้ (กรัม)
โชคอนันต์	2	100	0.2003	0.1008
	3	100	0.2010	0.1010
	4	100	0.2009	0.1013
	12วันหลังเก็บ เกี่ยว (สุก)	100	0.2007	0.0998
แรด	2	100	0.2006	0.1025
	3	100	0.2003	0.1081
	4	100	0.2005	0.0978
ทองดำ	2	100	0.2015	0.1015
	3	100	0.2009	0.1127
	4	100	0.2010	0.0871
น้ำดอกไม้	2	100	0.1988	0.0734
	3	100	0.2030	0.1087
	4	100	0.1990	0.0965

ตารางที่ 7 ความสามารถของสาร (I) โดยใช้ปริมาณสาร (I*)0.0010 g ของเปลือกผล
มะม่วงพันธุ์ โชคอนันต์ แรด ทองคำ และน้ำดอกไม้ ที่มีช่วงอายุต่างๆ

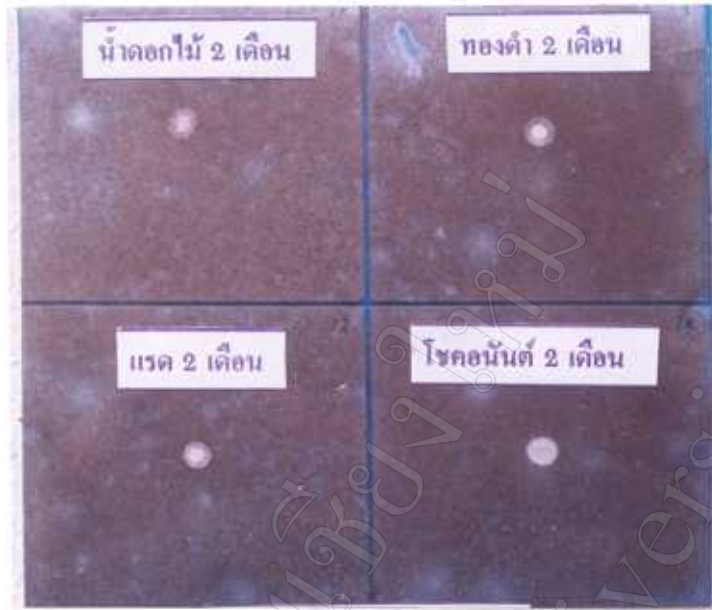
พันธุ์มะม่วง	ช่วงอายุ (เดือน)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ของบริเวณที่ยับยั้งการ เจริญของเชื้อ (mm.)	ปริมาณสาร (I) μg จากสมการ $y = 0.24570 + (1.4088 \times 10^{-2} x)$ $r = 0.994$
โชคอนันต์	2	11.0	763.37
	3	13.0	905.33
	4	10.0	692.38
	12 วันหลังเก็บ เกี่ยว (สุก)	3.0	195.51
แรด	2	3.5	231.00
	3	4.5	301.98
	4	3.0	195.51
ทองคำ	2	4.0	266.50
	3	6.5	443.95
	4	4.5	301.98
น้ำดอกไม้	2	3.5	231.00
	3	4.0	266.50
	4	2.5	160.02

ตารางที่ 8 ปริมาณของสาร (I) จากน้ำหนักเปลือกสด 1 กรัม ของเปลือกผล
มะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ แรด ทองคำ และน้ำดอกไม้

พันธุ์มะม่วง	ช่วงอายุ (เดือน)	ปริมาณสาร (I) μg ต่อน้ำหนัก เปลือกสด 1 g.
โชคอนันต์	2	769.48
	3	914.38
	4	701.38
	12 วันหลังเก็บเกี่ยว (สุก)	195.12
แรด	2	236.78
	3	326.44
	4	191.21
ทองคำ	2	270.50
	3	500.33
	4	263.02
น้ำดอกไม้	2	169.55
	3	289.69
	4	154.42

หมายเหตุ

สาเหตุที่ต้องทำ PTLC 1 ครั้งก่อน แล้วจึงนำมาเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. cladosporioides* เพราะถ้านำสารสกัดหยาบ 1 mg มาเปรียบเทียบกัน พบว่าในมะม่วงบางสายพันธุ์เมื่อนำมา spray เชื้อรา จะมองไม่เห็น inhibition area ถ้าใช้ปริมาณสารสกัดหยาบมากกว่า 1 mg spot 1 จุด แล้วนำไป run ใน developing solvent สารจะถูกแยกได้ไม่ดี เพราะปริมาณสารมากเกินไป จึงจำเป็นต้องทำ PTLC 1 ครั้งก่อน โดยเริ่มจากสารสกัดหยาบในปริมาณที่เท่ากันในมะม่วงทั้ง 4 พันธุ์ จากนั้นจุดแถบสารที่มี Rf ในช่วง 0.10 - 0.30 มารวมกัน โดยไม่ spray เชื้อรา เรียกสารนี้ว่า สาร (I*) แต่สาร (I*) ที่ได้ในปริมาณที่เท่ากันของมะม่วงทั้ง 4 สายพันธุ์ จะมีเนื้อสาร (I) ไม่เท่ากัน (เพราะจุดแถบสารโดยไม่ spray เชื้อรา) แต่สามารถหาปริมาณสาร (I) ได้ โดยนำขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition area ที่ได้จากการนำสาร (I*) 10,000 µg/ml spot ลงบน TLC เพลตแล้ว spray เชื้อรา มาเทียบกับ calibration curve และจากวิธีการคำนวณหน้า 38 จะทราบปริมาณสาร (I) (µg) ต่อน้ำหนักเปลือกสด 1 g ได้



รูปที่ 15 การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. cladosporioides* เมื่อใช้ปริมาณสาร (I*) 0.1000g จากสารสกัดที่ได้จากผลมะม่วงทั้ง 4 พันธุ์ ที่มีอายุ 2 เดือน ปรากฏบริเวณยับยั้งรอบจุดที่หยดสาร



รูปที่ 16 การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. cladosporioides* เมื่อใช้ปริมาณสาร (I*) 0.1000 g จากสารสกัดที่ได้จากผลมะม่วงทั้ง 4 พันธุ์ ที่มีอายุ 3 เดือน ปรากฏบริเวณยับยั้งรอบจุดที่หยดสาร



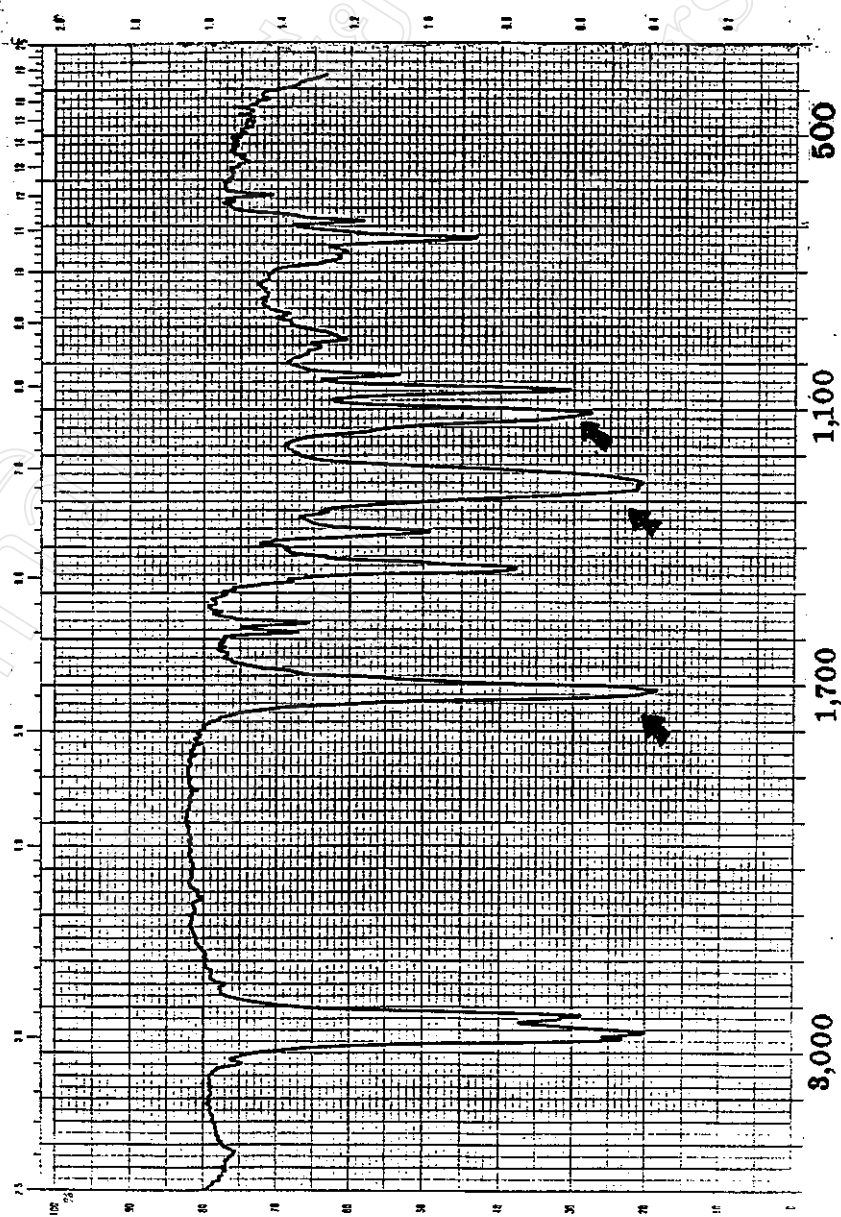
รูปที่ 17

การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. cladosporioides* เมื่อใช้ปริมาณสาร (I*)
 0.1000 g จากสารสกัดที่ได้จากผลมะม่วงทั้ง 4 พันธุ์ ที่มีอายุ 4 เดือน ปรากฏ
 บริเวณยับยั้งรอบจุดที่หยดสาร

การทดลองที่ 5 การศึกษาโครงสร้างของสารต้านเชื้อรา ที่มี Rf อยู่ในช่วง 0.10 - 0.30 โดยใช้เครื่องมือทาง spectroscopy และ chromatography ซึ่งได้แก่ IR , ^1H - NMR , GC และ GC-MS

นำสาร (I) ที่สกัดได้จากเปลือกมะม่วงไซคอนันต์ มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นอีกโดยทำ PTLC-Bioassay อีก 1 ครั้ง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือทาง spectroscopy และ chromatography ซึ่งได้แก่ Infrared spectrophotometer (IR) , Proton Nuclear Magnetic Resonance spectrometer (^1H - NMR) , Gas Chromatograph (GC) และ Gas Chromatograph - Mass Spectrometer (GC - MS) นำผลที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อหาสูตรโครงสร้างของสาร

การศึกษาและวิเคราะห์หาสารที่เป็นองค์ประกอบจากแถบสารที่มี Rf อยู่ในช่วง 0.10 - 0.30 โดยใช้ IR spectrophotometer ได้สเปกตรัมดังในรูปที่ 18



รูปที่ 18 อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร (I) วัดระห้ด้วย IR spectrometer

สภาวะที่ใช้หาสารที่เป็นองค์ประกอบในแถบสารที่มี Rf อยู่ในช่วง 0.10 - 0.30 โดยเครื่อง
Gas Chromatography (GC.)

Column	Capillary length 30 m
Stationary phase	DB 1
Carrier gas	He
Flow rate	30 kg/cm
injection volume	2 μ l
Detector	Flame Ionization Detector (FID)
Injection temp.	270 °C
Detection temp.	280 °C
Initial temp.	50 °C : 0 min
Range of temp.	50 - 270 °C rate 2 °C/ min

ปริมาตรที่ฉีด 2 ไมโครลิตร/ครั้ง โดยใช้หลอดฉีดขนาด 5 ไมโครลิตร ได้โครมาโต
แกรม ดังรูปที่ 19 พบว่ามีสารเพียงสารเดียวที่ Retention Time (R.T.) = 11.195

START

STOP

สาร (I)

CHROMATOPAC C-R6A
 SAMPLE NO 0
 REPORT NO 3567

FILE 1
 METHOD 0241

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.56	277017			5.1766	
2	0.780	242563	V		4.5328	
3	1.012	4800641	V		89.7093	
4	4.485	382			0.0071	
5	6.515	93			0.0017	
6	6.963	36			0.0007	
7	7.553	88			0.0016	
8	7.865	310			0.0058	
9	8.015	530	V		0.0099	
10	8.1	86	V		0.0016	
11	8.335	80	V		0.0015	
12	8.533	86	V		0.0016	
13	8.667	59	V		0.0011	
14	8.845	141	V		0.0026	
15	9.103	75	V		0.0014	
16	9.292	83	V		0.0016	
17	9.518	446	V		0.0083	
18	10.04	580			0.0108	
19	10.373	62			0.0012	
20	10.595	85	V		0.0016	
21	11.195	27893			0.5212	สาร (I)
TOTAL		5351334			100	

สถานะที่ใช้หาสารที่เป็นองค์ประกอบของแถบสารที่มี Rf อยู่ในช่วง 0.10 -0.80
โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography - Mass Spectrometer (GC - MS)

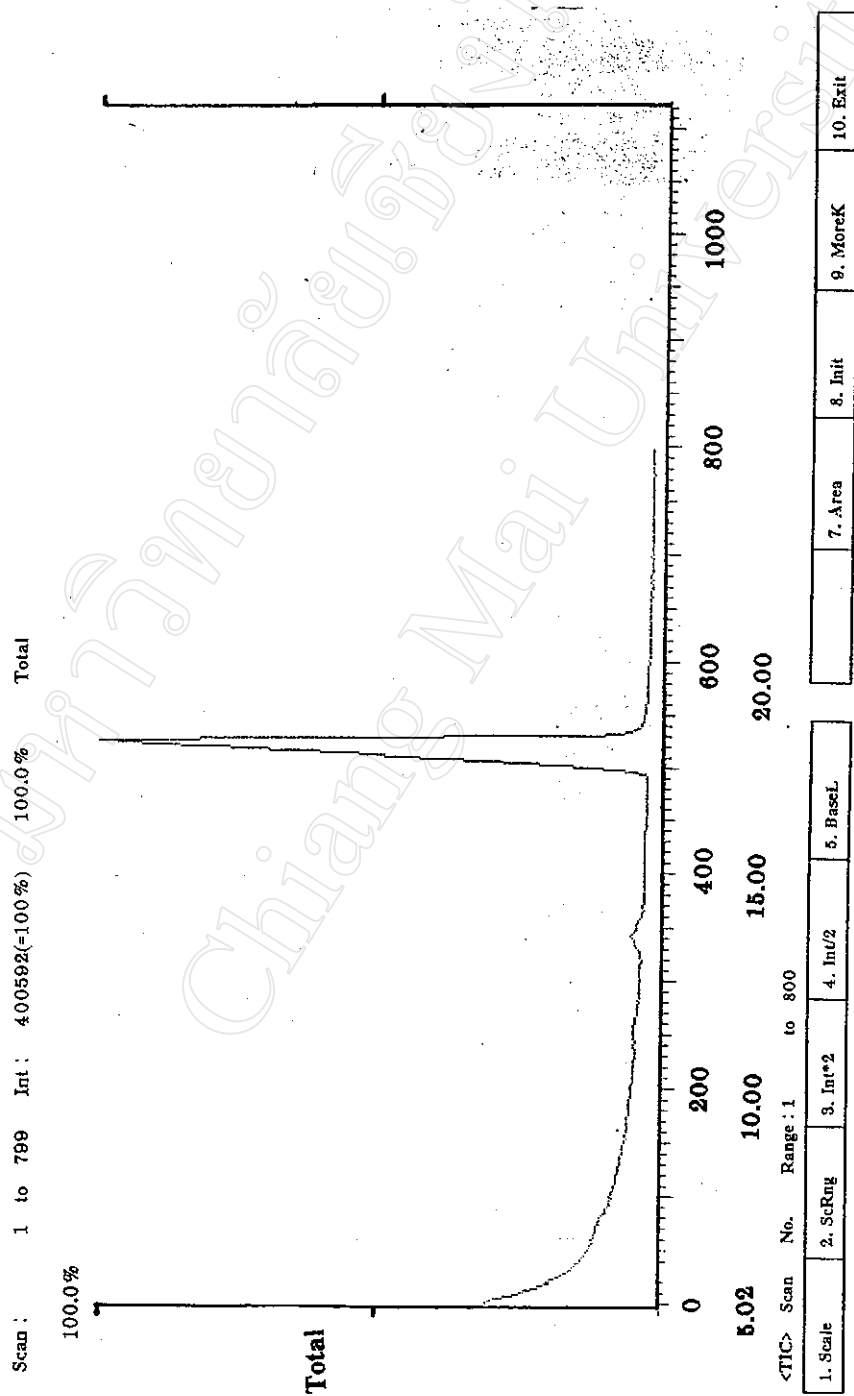
GC

Column	capillary length 30 m
Stationary phase	DB1
Detector	Flame Ionization Detector (FID)
Injection temp.	270 °C
Detection temp.	280 °C

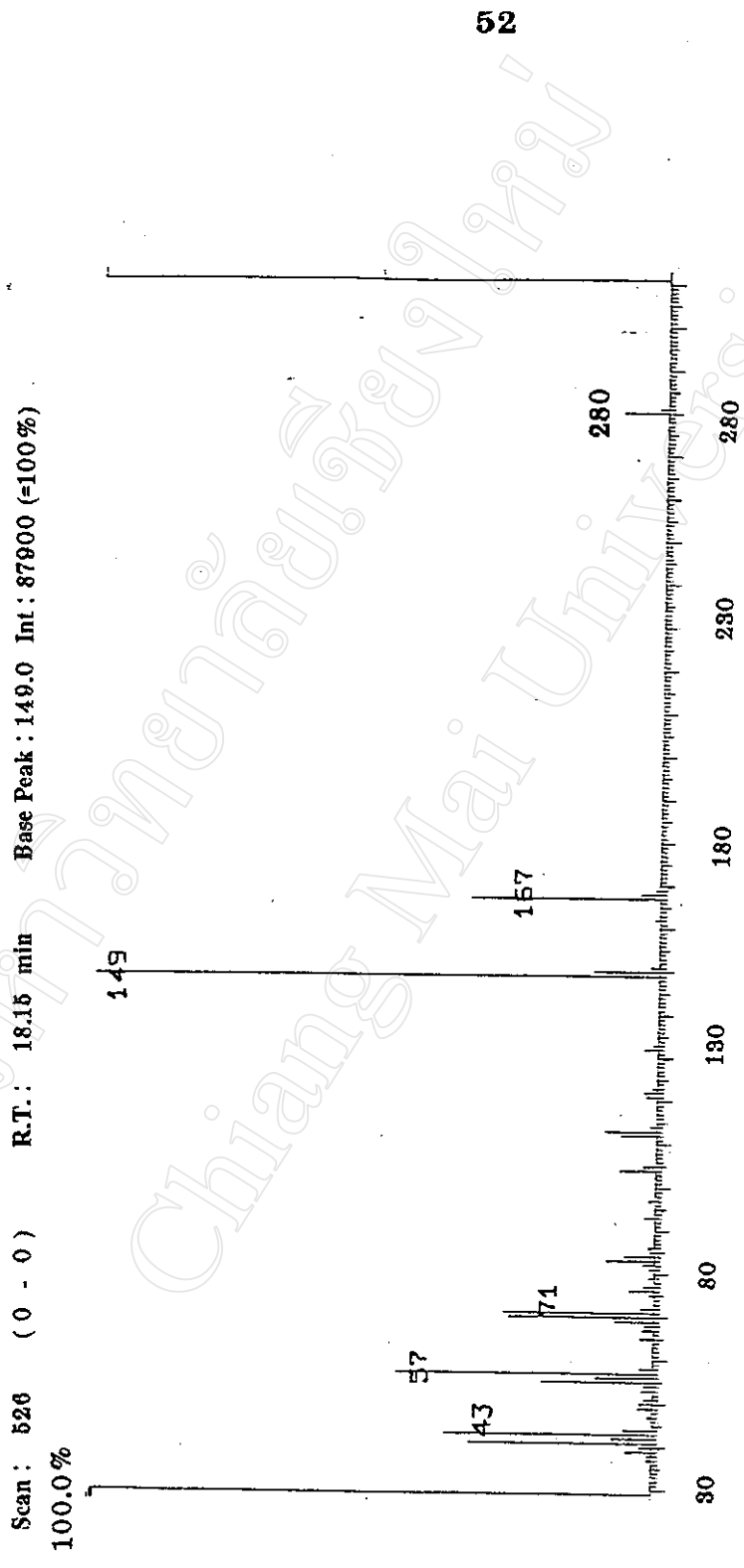
MS

Ionization mode	CI ⁺
Ion source temp.	210 °C
Ionization current	300 µA
Emission current	1.8 mA
Acceleration voltage	3 kV
Electron multiplier	130
Ionization voltage	70eV

ทำการฉีดสาร (I) เข้าไปในเครื่อง gas chromatography - mass spectrometer พบว่ามีเพียงสารเดียวที่ R.T. = 18 นาที (ดังแสดงในรูปที่ 20)
เมื่อนำสารที่ตำแหน่งนี้มาวิเคราะห์ด้วย mass spectrometer ได้ผลดังรูปที่ 21 ซึ่งมี base peak ที่ 149 และน้ำหนักมากที่สุดที่ 280



รูปที่ 20 โครมาโตแกรมของสาร (I) วิเคราะห์ด้วย gas chromatograph - mass spectrometer

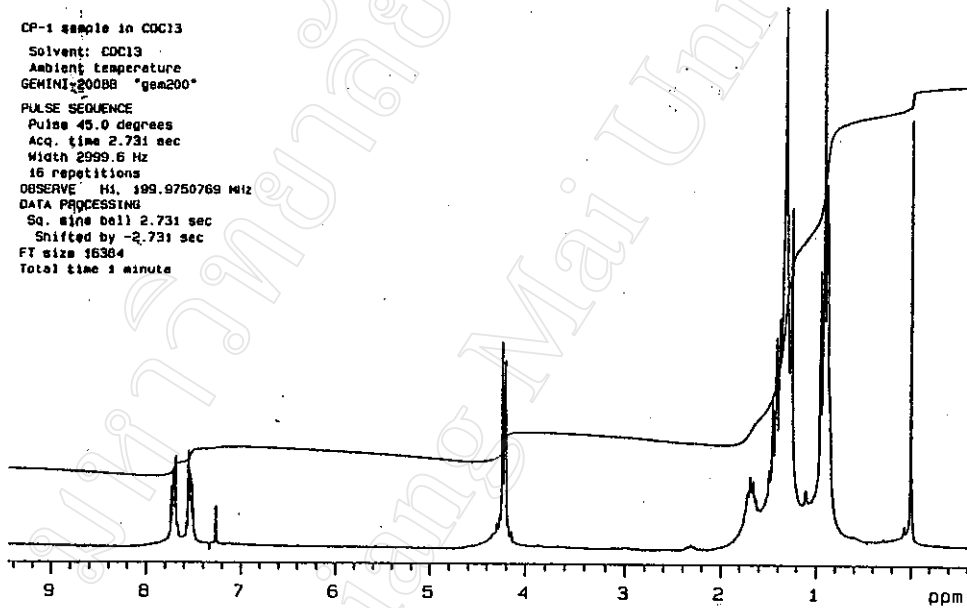


<SPECT>

1. BaseP	2. MsRing	3. Thres	4. Magni	6. Peak	8. Int*2	7. Int/2	9. Init	9. MoreK	10. Exit

รูปที่ 21 แผนสเปกตรัมของสาร (I) วิเคราะห์โดย gas chromatograph - mass spectrometer

นำสาร (I) ใน deuteriochloroform (CDCl_3) มาวิเคราะห์โดยใช้ ^1H - NMR spectrometer ได้สเปกตรัมดังรูปที่ 22 ซึ่งมีการ resonance ที่ δ (ppm) ดังต่อไปนี้ 7.60 (4H) , 4.20 (4H) และ 0.80 - 0.85 (48H)



รูปที่ 22

สเปกตรัมของสาร (I) วิเคราะห์โดย ^1H - NMR spectrometer