บทที่ 3
วิธีการทดลอง

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การทดสอบหาความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ในสภาพ *In vitro*

1.1 การเตรียมอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) สำหรับเลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides*

ปอกเปลือกมันฝรั่งแล้วนำไปชั่งให้ได้ 200 กรัม ล้างน้ำให้สะอาดแล้วหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กขนาดเท่าลูกเต๋า นำไปต้มในน้ำกลั่นขนาด 500 มิลลิลิตร จนกระทั่งเนื้อมันฝรั่งสุก นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง เตรียมน้ำกลั่นอีก 500 มิลลิลิตร เพื่อละลายผงวุ้นกับน้ำตาล dextrose เข้าด้วยกัน ต้มพอเดือด ผสมน้ำต้มมันฝรั่งกับน้ำต้มผงวุ้นและน้ำตาล คนให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปเทใส่ flask flask ละ 200 มิลลิลิตร ปิดจุก flask ด้วยจุกสำลี จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}C นาน 20 นาที

1.2 การแยกเชื้อ *C. gloeosporioides* จากใบมะม่วงที่เป็นโรคแอนแทรคโนส

แยกเชื้อ *C. gloeosporioides* จากใบมะม่วงที่มีอาการของโรคแอนแทรคโนสที่นำมาจากแปลงทดลองของภาควิชาพืชสวนมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยวิธี tissue transplanting ด้วยการใช้ใบมีดที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ตัดชิ้นส่วนของใบมะม่วงบริเวณที่เป็นโรคซึ่งเป็นส่วนรอยต่อระหว่างส่วนที่เป็นโรคและส่วนที่เป็นใบปกติ ขนาด 5 x 5 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยการแช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วินาที แช่ในน้ำยา 10 เปอร์เซ็นต์ clorox เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 1 นาที ซับให้แห้งบนกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำมาวางบนจานอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ถ่ายเชื้อลงบนอาหาร MYA เพื่อกระตุ้นให้เชื้อสร้างสปอร์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เชื้อ *C. gloeosporioides* จะสร้างสปอร์จำนวนมาก ทำการคัดเลือก single spore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์มาเลี้ยงต่อให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

หลังจากแยกเชื้อ *C. gloeosporioides* แล้วจึงทำการตรวจสอบการเกิดโรคบนผลมะม่วง โดยนำ spore suspension ปริมาตร 10^{6} สปอร์/มิลลิลิตร ไปปลูกเชื้อบนผลมะม่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สุก ด้วยการนำพู่กันจุ่ม spore suspension แล้วทาบนผลบริเวณที่ทำแผลไว้ ในการปลูกเชื้อจะปลูกเชื้อ 5 จุด ต่อผล ทดลอง 5 ซ้ำ จากนั้นนำไปวางบนตะแกรงลวดในกล่องพลาสติกที่รองพื้นกล่องด้วยกระดาษชุบน้ำกลั่นปลอดเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจสอบการเกิดโรคที่เกิดขึ้นบนผลมะม่วง

1.3 การทดสอบหาความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อ *C. gloeosporioides* บนจานอาหาร PDA

ใช้ไคโตซานที่ผลิตโดย Nippon Kayaku Co.,Ltd จากประเทศญี่ปุ่น ลักษณะเป็นผง สีเหลืองอ่อน นำมาละลายในกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ นำไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างๆ ผสมลงในอาหาร PDA แล้วจึงทำการเลี้ยงเชื้อ *C. gloeosporioides* เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อของไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างๆ ส่วนไคโตซานจากเห็ดหอมทำการสกัดตามวิธีของ อาทิตย์ (2550) ซึ่งจะได้ไคโตซานลักษณะเป็นผงสีเหลืองเข้ม

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม ไม่ผสมไคโตซานในอาหาร PDA (ไคโตซาน 0 เปอร์เซ็นต์)
กรรมวิธีที่ 2 ชุดควบคุม ผสมสารละลายกรดอะซิติก 1เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 3 ผสมไคโตซาน 0.10 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 4 ผสมไคโตซาน 0.25 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 5 ผสมไคโตซาน 0.50 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 6 ผสมไคโตซาน 0.75 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 7 ผสมไคโตซาน 1.00 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 8 ผสมไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 9 ผสมไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์+ไคโตซาน 0.10 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 10 ผสมไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์+ไคโตซาน 0.25 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 11 ผสมไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์+ไคโตซาน 0.50 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 12 ผสมไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์+ไคโตซาน 0.75 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 13 ผสมไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์+ไคโตซาน 1.00 เปอร์เซ็นต์

ในแต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ซึ่งหลังจากวางเชื้อ *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25^{o}C วัดการเจริญเติบโตของโคโลนีของเชื้อราแล้วบันทึกผลที่ได้ทุก 2 วัน

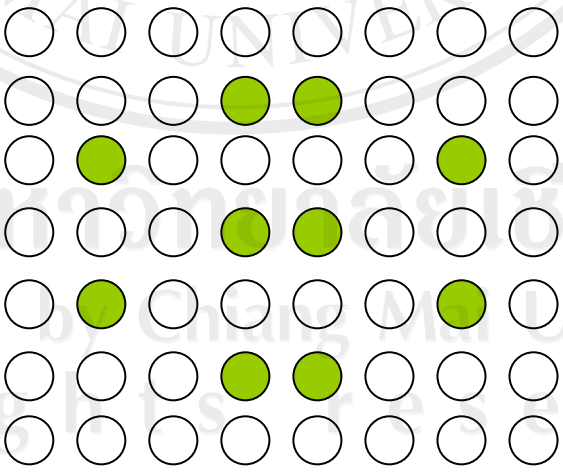
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4 การเคลือบผิวมะม่วงด้วยไคโตซาน

มะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้จากสวนคุณอัครพล อำเภอบ้านธิ จังหวัดลำพูน โดยใช้ผลมะม่วงที่มีอายุ 90, 100, 110 และ 120 วัน หลังดอกบาน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) โดยแบ่งกรรมวิธีในการทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เคลือบผิวด้วย ไคโตซาน 0.50 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 2 เคลือบผิวด้วย ไคโตซาน 0.75 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 3 เคลือบผิวด้วย ไคโตซาน 1.00 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 4 เคลือบผิวด้วยไคโตซาน 0.50 เปอร์เซ็นต์ + ไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 5 เคลือบผิวด้วยไคโตซาน 0.75 เปอร์เซ็นต์ + ไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 6 เคลือบผิวด้วยไคโตซาน 1.00 เปอร์เซ็นต์ + ไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์
กรรมวิธีที่ 7 ชุดควบคุม (control) จุ่มน้ำเปล่า

ในแต่ละกรรมวิธีจะทดลองกับมะม่วง 100 ผล ซึ่งการทดลองนี้ใช้มะม่วงจำนวน 10 ต้น (ภาพ 3.1) ดังนั้นแต่ละกรรมวิธีจะใช้ผลมะม่วงจำนวน 10 ผลต่อต้น ขั้นตอนของการเคลือบผิวจะใช้ วิธีการจุ่มผลมะม่วงเป็นเวลา 10 วินาที เมื่อเคลือบผิวเรียบร้อยแล้วจึงติด label ไว้บริเวณก้านผล จากนั้น 3 วันจึงกลับไปเก็บผลมะม่วงเพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อในห้องทดลอง



ภาพ 3.1 ไดอะแกรมของต้นมะม่วงที่เลือกทำการทดลอง
○ ต้นมะม่วงที่ไม่ได้เลือกใช้ในการทดลอง
● ต้นมะม่วงที่เลือกใช้ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.2 ลักษณะผลของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ที่มีอายุ 90, 100, 110 และ 120 วัน

การทดลองที่ 2 การตรวจหาสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยวิธี PTLC bioassay

2.1 การสกัดสารและการแยกสารโดยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC)

2.1.1 การคัดเลือกมะม่วง

ทำการเก็บผลมะม่วงที่ผ่านการเคลือบผิวด้วยกรรมวิธีต่างๆ โดยสุ่มเก็บจากต้นมะม่วงทุกต้นที่ได้ทำการทดลอง จากนั้นนำผลมะม่วงใส่ในตะกร้าพลาสติก ซึ่งหลังจากเก็บผลมะม่วงมาแล้วจะนำไปทำการสกัดสารในห้องทดลองทันที

2.1.2 การสกัดสาร

การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) จากผิวมะม่วง

ปอกเปลือกมะม่วงหนาประมาณ 2 - 3 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปหั่น แล้วชั่งบันทึกน้ำหนักของเปลือกสด แล้วนำไปปั่นในเครื่องปั่นความเร็วสูงประมาณ 2 นาที พร้อมกับเติมเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นลงไปเล็กน้อยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปั่น จากนั้นนำมาแช่เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนของเปลือกมะม่วงต่อเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 50 กรัม ต่อ 150 มิลลิลิตร กรองเอากากออกโดยใช้ผ้าขาวบาง กากที่ได้นำไปสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ อีกครั้ง นำสารละลายที่ได้มากรองเอาตะกอนออก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 นำไประเหยเอาเอธานอลออกให้เหลือ 1 ใน 3 ส่วน โดยใช้เครื่องระเหยภายใต้ความดันต่ำ (rotary evaporator) และใช้อุณหภูมิที่ water bath 50 ^{o}C นำสารละลายที่ได้มาใส่กรวยแยก ทิ้งไว้สักครู่แล้วจึงเติมไดคลอโรมีเธนปริมาตรเท่ากับสารละลายที่ได้ เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ไขเอาชั้นของไดคลอโรมีเธนซึ่งอยู่ชั้นล่างออก ส่วนที่เหลือเติมไดคลอโรมีเธน เขย่าให้เข้ากัน และแยกเอาสารละลายที่อยู่ในชั้นของไดคลอโรมีเธนออกและนำไปรวมกับครั้งแรก กำจัดน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟต กรองเอาโซเดียมซัลเฟตออก แล้วนำไประเหยเอาไดคลอโรมีเธนออกจนแห้ง ละลายส่วนสกัดหยาบที่ได้ด้วยไดคลอโรมีเธนเล็กน้อย แล้วนำไปเก็บใส่ขวดสารตัวอย่าง ปล่อยให้ไดคลอโรมีเธนระเหยจนแห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักบันทึกปริมาณของส่วนสกัดหยาบที่ได้นำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -4 ^{o}C

2.1.3 การทำ Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC)

การเตรียม TLC plate สำหรับแยกสาร

ใช้แผ่น TLC ที่เคลือบบนอลูมีเนียมสำเร็จรูป (Silica Gel F 254TLC Aluminium Sheet) ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร

การเตรียมตัวทำละลายเคลื่อนที่ (developing solvent)

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

การเตรียม tank สำหรับ PTLC

นำตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่เตรียมไว้ใส่ลงใน tank ที่มีขนาด 20 x 5 x 20 เซนติเมตร โดยให้ความสูงของตัวทำละลายสูงประมาณ 1.5 เซนติเมตร ใส่กระดาษกรอง Whatman No.1 2 แผ่นไว้ด้านข้างเพื่อให้ไอสารอิ่มตัว ปิดฝาทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงให้ไออิ่มตัวทั้ง tank

2.1.4 การใส่สารสกัดหยาบ (crude extract) ลงบน TLC plate

ชั่งสารสกัดหยาบที่เตรียมได้ประมาณ 0.20 กรัม ละลายด้วยไดคลอโรมีเธนเล็กน้อย ใช้ haematocrit หยดสารลงไปบน plate ที่เตรียมไว้ โดยหยดสารละลายที่ได้ให้ห่างจากขอบล่าง 2.5 เซนติเมตร เป็นแบนด์ ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยไปจนหมด นำ plate ที่ได้ใส่ลงใน tank ที่เตรียมไว้ เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึง solvent front ซึ่งมีระยะห่างจากจุดที่หยดสาร 15 เซนติเมตร นำ plate ออกจาก tank ทิ้งไว้ในตู้ดูดควันประมาณครึ่งชั่วโมง บันทึกลักษณะของ โครมาโตรแกรมที่ปรากฏบนแผ่น TLC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 การตรวจสอบหาสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยวิธี PTLC bioassay มีขั้นตอนดังนี้

2.2.1 การเตรียมกล่องบ่มเชื้อ

นำกล่องพลาสติก ขนาด 15 x 25 x 12 เซนติเมตร มาล้างน้ำแล้วผึ่งลมให้แห้ง เช็ดด้วยเอธานอล 70เปอร์เซ็นต์ อีกครั้งเพื่อฆ่าเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้กล่องแห้ง จากนั้นบุด้านล่างของกล่องและฝาปิดด้วยทิชชู สเปรย์ด้วยน้ำกลั่นให้ชุ่ม ปิดฝาตั้งทิ้งไว้เป็นกล่องบ่มเชื้อ

2.2.2 การเตรียม spore suspension ของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

เทน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในจานอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อราอายุ 7 วัน จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลเกลี่ยให้เส้นใยและสปอร์ของเชื้อราหลุดจากผิวหน้าอาหาร นำไปกรองบนผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อกรองเอาเศษวุ้นและเส้นใยของเชื้อราออก จากนั้นหยด tween 20 ลงไปใน spore suspension ประมาณ 0.004 มิลลิลิตร เพื่อให้สปอร์ของเชื้อรากระจายได้ดีขึ้น (ทวีสิน, 2539) จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า แล้วใช้ลูปที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงใน spore suspension นำ spore suspension ที่ติดอยู่ที่ลูปแตะลงบนขอบของ cover glass ที่ปิดทับอยู่บน scale ของ Haemacytometer โดยจุ่มแตะทั้งสองด้าน จากนั้นทำการตรวจนับสปอร์ของเชื้อราใต้กล้อง compound microscope ปรับความเข้มข้นของสารละลายแขวนลอยจนได้สปอร์เข้มข้น 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร

2.2.3 การพ่นเชื้อรา *C. gloeosporioides* ลงบนแผ่น TLC (PTLC-Bioassay)

นำ spray gun มาล้างด้วยเอทานอล 70เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำแผ่น TLC ที่ใส่สารสกัดหยาบแล้วมาวางในตู้ดูดควัน ทำการพ่นเชื้อให้ทั่วแผ่นพอหมาดๆ จากนั้นนำใส่กล่องบ่มเชื้อที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 คืน บันทึก R_f ของแต่ละแถบที่เกิด inhibition area (โดยแถบที่สนใจคือแถบที่มี R_f อยู่ในช่วง 0.10 – 0.30)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของสารเคลือบผิวไคโตซานในการกระตุ้นการสร้างสารต้านเชื้อราของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์

3.1 การทำ calibration curve

ชั่งน้ำหนักเปลือกสด 100 กรัม ของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ที่มีอายุ 120 วัน ที่เคลือบผิวด้วยไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับไคโตซาน 0.50 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้บนต้น 3 วัน แล้วเก็บกลับมาวิเคราะห์ บดให้ละเอียดและสกัดสารสกัดหยาบตามข้อ 2.1.2 ได้ส่วนสกัดหยาบ 0.2601 กรัม ละลายสารสกัดหยาบด้วยไดคลอโรมีเธนปริมาตร 0.1 ml จากนั้นนำไปทำ band บนแผ่น TLC ตามข้อ 2.1.4 แล้วนำไป spray เชื้อรา ขูดแถบที่มี R_f 0.10 – 0.30 มารวมกันแล้วสกัดด้วยไดครอโรมีเธนกับเมธานอลในอัตราส่วน 1 : 1 กรองเอาซิลิกาเจลออก จากนั้นกำจัดน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟต แล้วกรองเอาโซเดียมซัลเฟตออก นำไประเหยเอาตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิของ water bath 50^{o}C จนแห้ง ถ่ายสารที่ได้ลงในขวดตัวอย่างโดยละลายด้วยไดคลอโรมีเธนเล็กน้อย จากนั้นนำสารที่ได้ spot ลงบนแผ่น TLC แล้วนำไป spray เชื้อราอีกครั้ง ขูดแถบสารที่มี R_f 0.10 – 0.30 มารวมกันแล้วทำตามวิธีข้างต้น จะได้สารที่มี R_f 0.10 – 0.30 ที่มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง เรียกสารนี้ว่าสาร (I) ได้สาร (I) 0.1501 กรัม นำสาร (I) ที่ได้มาทำ calibration curve โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 10000, 15000 และ 20000 µg/ml นำสารละลายที่ได้มา 100 µl spot ลงบน แผ่น TLC จะได้ปริมาณสาร (I) เท่ากับ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 1500 และ 2000 µg บนแผ่น TLC โดยทำ 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้น ทิ้งไว้จนตัวทำละลายละเหยหมด จากนั้นจึงนำไปทดสอบกับเชื้อ *C. gloeosporioides* ตามข้อ 2.2.3 เพื่อหา inhibition area โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition area ที่ได้แต่ละจุด จากนั้นนำผลที่ได้ไป plot กราฟระหว่างขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition area กับน้ำหนักของสาร

3.2 การเปรียบเทียบปริมาณสาร (I) ในมะม่วงทั้ง 4 ช่วงอายุ ที่ผ่านกรรมวิธีต่างๆ

นำเปลือกสดของมะม่วงอายุ 90, 100, 110 และ 120 วันที่ผ่านกรรมวิธีต่างๆ อย่างละ 100 กรัม มาบดละเอียดและสกัดตามข้อ 2.1.2 นำสารสกัดหยาบที่ได้มาแยกโดย TLC ขูดแถบที่มี R_f ในช่วง 0.10 – 0.30 มารวมกัน ได้สาร (I) ประมาณ 0.1000 กรัม นำสาร (I) มาละลายในไดคลอโรมีเธนให้ได้ความเข้มข้น 10000 µg/ml โดยชั่งสาร (I) 0.0010 กรัม ละลายในไดคลอโรมีเธน 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ทั้งหมดมา spot ลงบนแผ่น TLC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นนำมา spray เชื้อรา เพื่อหา inhibition area จากนั้นใช้ calibration curve เทียบหาน้ำหนักของสาร (I) ได้ และสามารถคำนวณหาน้ำหนักของสาร (I) ในเปลือกสด 1 กรัม

3.3 การศึกษาโครงสร้างของสารต้านเชื้อราที่มี R_f อยู่ในช่วง 0.10 – 0.30 โดยใช้เครื่องมือทาง spectroscopy และ chromatography

นำสาร (I) ที่สกัดได้จากเปลือกมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำ PTLC – Bioassay อีก 1 ครั้ง ขูดแถบสารที่มี R_f อยู่ในช่วง 0.10 – 0.30 นำมาสกัดสารออกด้วยตัวทำละลาย เมธานอล : ไดคลอโรมีเธน อัตราส่วน 1 : 1 กรองซิลิกาเจลและสปอร์ออกด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บส่วนสารละลายที่ใส นำมากำจัดน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟต ระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้ความดันต่ำ (rotary evaporator) และใช้อุณหภูมิที่ water bath 50 ^{o}C นำสารที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือทาง spectroscopy และ chromatography ซึ่งได้แก่ Infrared spectrophotometer (IR), Proton Nuclear Magnetic Resonance spectrometer (^{1}H – NMR), Gas Chromatography (GC) และ Gas Chromatograph – Mass Spectrometer (GC – MS) นำผลที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อหาสูตรโครงสร้างของสาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved