บทที่ 2

การทดลองและผลการทดลอง

2.1 สมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 **ฟ้าทะลายโจร** จากสวนสมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เก็บในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ.2543ใช้ใบสดแก่

2.1.2 กระชาย จาก ตลาดต้นพะยอม ใช้รากสด

2.1.3 มะนาวแป้น จาก ตลาดต้นพะยอม ใช้ใบแก่สด และเปลือกผลสด

2.1.4 มะนาวน้ำหอม จาก สวนแม่แตง เก็บในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2543 ใช้ใบแก่สด และเปลือกผลสด

2.2 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

2.2.1 แบคทีเรีย *Serratia marcescens*

2.3 เชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

2.3.1 เชื้อรา *Cladosporium cladosporioides*

2.4 **อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง**

อุปกรณ์	บริษัท
■ Gas chromatrography รุ่น GC-14A	Shimadzu Japan
■ Gas chromatrography - Mass spectrometer GC-MS-QP 2000a	Shimadzu Japan
■ เครื่องระเหยภายใต้ความดันต่ำ (rotary evaporator)	Buchi Rotavopour
■ เครื่องบด (blender)	National
■ หม้อนึ่ง (autoclave)	
■ เครื่องแก้วพื้นฐาน	
■ Haemacytometer	

2.5 **สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง**

สาร	บริษัท
■ Acetone	J.T.BAKER
■ Dichloromethane	SOLVAY
■ Hexane	Merck Germany
■ Methanol	E- Merck Germany
■ Agar	ตราบิกเบน
■ Silica gel 602G	Merck Germany
■ Sodium sulphate anhydrous	Carlo erbs reagent

2.6 ระบบ Deverlopling Solvent ที่ใช้ในการทดลอง

1. dichloromethane : methanol = 98 : 2 เป็นระบบที่ 1
2. dichloromethane : methanol = 95 : 5 เป็นระบบที่ 2
3. hexane : dichloromethane = 65 : 35 เป็นระบบที่ 3
4. hexane : dichloromethane = 3 : 7 เป็นระบบที่ 4

หมายเหตุ ตัวทำละลายกลั่นก่อนใช้ทุกครั้ง

2.7 **การสกัดและการทดสอบสารต้านเชื้อราและแบคทีเรียจากพืชสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด**

2.7.1 การสกัด

ชั่งสมุนไพรสด (บดละเอียด) 100 กรัม เติม dichloromethane จนท่วม คนทิ้งไว้2ชั่วโมง กรองเอากากออกแล้วเก็บสารละลายที่สกัดได้

นำกากมาสกัดต่อโดยเติม dichloromethaneท่วมคนทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงนำเอาสารละลายที่สกัดได้ทั้งสองครั้งมารวมกันหลังจากนั้นนำไประเหยภายใต้ความดันต่ำจนเหลือประมาณ 50 ml เติม Sodium sulphate anhydrous เพื่อกำจัดน้ำโดยเติมแล้วเขย่าจน Sodium sulphate ไม่จับกันเป็นก้อนและไม่หนืด จึงกรองเอา Sodium sulphate ออก

นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยภายใต้ความดันต่ำจนได้สารสกัดหยาบสีดำ

2.7.2 การทดสอบการต้านเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* โดยวิธี TLC-Bioassay

2.7.2.1 การเตรียม TLC-plate

นำกระจกใสขนาดที่ต้องการวางบนฐานเคลือบเพลตเช็ดด้วย acetone ล็อกฐานเคลือบเพลตให้แน่นชั่ง silica gel 60 กรัม และน้ำ 120 ml ใส่ในขวดรูปชมพู่ปิดฝาด้วยจุกให้แน่นเขย่าเพื่อให้เป็น suspension เทส่วนผสมลงใน applicator เลื่อนภาชนะให้ suspensionไหลบนเพลตความหนา 1 mm รอให้แห้งสนิทแล้วจึงนำไปใส่ lack นำไปอบที่อุณหภูมิ 120 °เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.7.2.2 เตรียม tank สำหรับ TLC

ใส่ deverlopling solvent ใน tank ขนาด 9 * 12 นิ้ว สูงประมาณ 1.5 ซ.ม. ใส่กระดาษกรองด้านข้างของ tank ปิดฝาทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ไอของตัวทำละลายเคลื่อนที่อิ่มตัวใน tank

2.7.2.3 การแยกสารสกัดหยาบบนแผ่น TLC

นำสารสกัดหยาบละลาย dichloromethane เล็กน้อย ใช้ capillary หยดสารละลายลงบน plateห่างกระจกขอบล่าง 2.5 cm เป็นแถบยาวติดต่อกันรอให้ dichloromethane แห้งจึงจุดสารทับอีกครั้งหนึ่ง นำplateที่ได้ใส่ในtank เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนถึง solvent front ประมาณ 15.0 cmนำ plate ออกจาก tank ทิ้งไว้ในตู้ควันประมาณครึ่งชั่วโมงเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยไป

2.7.2.4 การทดสอบการต้านเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides*

2.7.2.4.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา

สูตรอาหารเหลว PDB (Potato Dextrose Broth)

มันฝรั่ง	200 กรัม
กลูโคส	20 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

สูตรอาหารแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar)

มันฝรั่ง	200 กรัม
กลูโคส	20 กรัม
ผงวุ้น	17 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ปอกเปลือกมันฝรั่งออกแล้วล้างด้วยน้ำสะอาด หั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กๆชั่งน้ำหนักให้ได้ 200 กรัม นำไปต้มกับน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จนเนื้อมันฝรั่งสุกแต่อย่าให้เละกรองเอาชิ้นมันฝรั่งออก รอให้น้ำต้มมันฝรั่งเย็นลงแล้วเติม น้ำตาลกลูโคส 20 กรัม และผงวุ้น 17 กรัม ลงไป (ในการทำ PDB ไม่ต้องเติมผงวุ้นลงไป) ต้มต่อไปจนเดือดรอให้เย็นลงแล้วจึงตักใส่ขวดขวดละ 100 มิลลิลิตร ปิดจุกขวดด้วยสำลีแล้วใช้กระดาษปิดทับมัดด้วยยางรัดให้แน่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (อุณหภูมิจะอยู่ที่ 121 $^{\circ}$ C) นาน 20 นาที

2.7.2.4.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides*

นำจานเลี้ยงเชื้ออบที่อุณหภูมิ 180° C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น นำอาหารแข็ง PDA อุ่นด้วยไมโครเวฟที่ความแรงระดับปานกลางเป็นเวลา 3 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นพอประมาณนำมาเทใส่จานเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร ต่อ 1 จาน หยดกรดแลคติก 25 %ลงไป 1 หยด เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ปิดฝาแล้วตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว จากนั้นใช้ loopแตะสปอร์เชื้อราจากจานที่มีเชื้อราเดิมอยู่มา streak บนจานใหม่ให้เต็มผิวหน้าของอาหารในจานเลี้ยงเชื้อเก็บไว้อุณหภูมิห้องประมาณ 3 วันจะมีเชื้อราใหม่เกิดขึ้น

2.7.2.4.3 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา

เทน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร ลงบนจานที่มีเชื้อราอายุ 5-7 วัน ใช้ loop เขี่ยเชื้อราเพื่อให้สปอร์กระจายตัวออกมา รองด้วยผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อกรองเอาเส้นใยและวุ้นออก นำไปนับให้ได้สปอร์ 25 * 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เติม Tween20 1 หยด เพื่อให้สปอร์ของเชื้อรากระจายตัวเขย่าให้เข้ากันแล้วปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยอาหารเหลว PDBจนได้ 25 มิลลิลิตร นำไปนับให้ได้สปอร์ให้ได้ 1 * 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร โดยใช้ Haemacytometer และ counter

2.7.2.4.3 การเตรียมกล่องบ่มเชื้อ (ขนาด 25 * 25 ซ.ม.)

ล้างกล่องพลาสติกที่ใช้เป็นกล่องบ่มเชื้อให้สะอาด เมื่อแห้งแล้วให้เช็ดทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์เพื่อฆ่าเชื้อ รอให้แห้งแล้วบุกล่องด้วยกระดาษทิชชูและพ่นน้ำกลั่นให้ทั่วปิดฝาทิ้งไว้เพื่อให้ไอน้ำอิ่มตัว

2.7.2.4.4 ผลทดสอบการต้านเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ของสารสกัดจากใบฟ้าทะลายโจร หัวกระชาย ใบและเปลือกมะนาวแป้น ใบและเปลือกของมะนาวน้ำหอม

นำแผ่น TLCที่ได้จากการแยกสารสกัดหยาบของพืชแต่ละชนิดมาฉีดพ่นเชื้อราที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB แล้วนำใส่ในกล่องบ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน โดยเทียบกับcontrol ซึ่งเป็นแผ่น TLC ที่ไม่ได้จุดสารสกัดหยาบ เมื่อครบกำหนดปรากฏว่ามีแถบต้านเชื้อรา ดังตาราง 2.1 และรูป 2.1-2.7

ตาราง 2.1 R_f ต้านเชื้อราของสารสกัดพืชแต่ละชนิดจากแผ่น TLCหลังจากฉีดพ่นเชื้อราได้2วัน (ใช้ตัวทำละลายระบบที่ 1 และเฟสคงที่ คือ ซิลิเจล)

สารสกัดของสมุนไพร	R_f แสดงผลต้านเชื้อรา (ใช้ตัวทำละลายระบบที่ 1 และเฟสคงที่ คือ ซิลิเจล)
ฟ้าทะลายโจรส่วนใบแก่สด	0.05-0.10
กระชายส่วนรากสด	0.69-0.79
	0.97-0.99
ใบมะนาวแป้น(ใบแก่สด)	0.96-1.00
เปลือกผลมะนาวแป้นสด	0.93-0.96 (เห็นไม่ค่อยชัดเจน)
ใบมะนาวน้ำหอม(ใบแก่สด)	0.93-0.97
เปลือกผลมะนาวน้ำหอมสด	-

รูป 2.1 แถบสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* (บริเวณ R_f0.05-0.10) จากสารสกัดหยาบของฟ้าทะลายโจรใช้ตัวพาในระบบที่1และเฟสคงที่ คือ ซิลิกาเจล

รูป 2.2 แถบสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* (บริเวณ R_f0.69-0.79, R_f0.97-0.99)จากสารสกัดหยาบของกระชายใช้ตัวพาในระบบที่1และเฟสคงที่ คือ ซิลิกาเจล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

รูป 2.3 แถบสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* (บริเวณ R_f0.96-1.00) จากสารสกัดหยาบของใบมะนาวแป้นใช้ตัวพาในระบบที่1และเฟสคงที่ คือ ซิลิกาเจล

รูป 2.4 แถบสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* (บริเวณ R_f0.93-0.96) จากสารสกัดหยาบของเปลือกผลมะนาวแป้นใช้ตัวพาในระบบที่1และเฟสคงที่ คือ ซิลิกาเจล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

รูป 2.5 แถบสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* (บริเวณ R_f0.93-0.97) จากสารสกัดหยาบของใบมะนาวน้ำหอมใช้ตัวพาในระบบที่1และเฟสคงที่ คือ ซิลิกาเจล

รูป 2.6 TLC plate หลังจากฉีดพ่นเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* จากสารสกัดหยาบของเปลือกผลมะนาวน้ำหอมใช้ตัวพาในระบบที่1 และเฟสคงที่ คือซิลิกาเจล

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

รูป 2.7 control (TLC plate ที่ไม่ได้จุดสารสกัดหยาบ) ใช้ตัวพาระบบที่ 1 และเฟสคงที่ คือซิลิกาเจล

2.7.2.4.5 การแยกสารบริเวณที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากซิลิกาเจล

ขูดเอาแถบสารในช่วง R_f ที่มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราของพืชแต่ละชนิดจำนวน 60เพลตแล้วนำซิลิกาเจลที่มี R_f เท่ากันมารวมกันและสกัดด้วย dichloromethane : methanol 50:50 โดยทำการสกัดหลายๆครั้งกรองเอาซิลิกาเจลออก เก็บสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำแล้วนำไปทำ โครมาโตรกราฟีผิวบางอีกครั้งโดยR_f0.05-0.10ของสารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจรผ่านการชะด้วยตัวพาในระบบที่2 ส่วนR_fอื่นของพืชชนิดอื่นชะด้วยตัวพาในระบบที่3 หลังจากนั้นทดสอบด้วยการพ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราลงบนเพลต

เมื่อพ่นสารละลายแขวนลอยของสปอร์เชื้อราพบว่าพืชแต่ละชนิดเกิดแถบยับยั้งเชื้อราดังรูป 2.8-2.12

รูป 2.8 แถบสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* (บริเวณ R_f0.93-0.98) จาก inhibit zone (บริเวณ R_f0.05-0.10)สารสกัดหยาบของใบฟ้าทะลายโจรใช้ตัวพาในระบบที่2 และเฟสคงที่ คือซิลิกาเจล

รูป 2.9 แถบสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* (บริเวณ R_f0.97 –1.00) จาก inhibit zone (บริเวณ R_f0.69-0.79)สารสกัดหยาบของกระชายใช้ตัวพาในระบบที่3และเฟสคงที่ คือซิลิกาเจล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

รูป 2.10 แถบสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* (บริเวณ R_f0.10 -0.13) จาก inhibit zone (บริเวณ R_f0.97-0.99)สารสกัดหยาบของกระชายใช้ตัวพาในระบบที่3และเฟสคงที่ คือซิลิกาเจล

รูป 2.11 แถบสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* (บริเวณ R_f0.10 -0.20) จาก inhibit zone (บริเวณ R_f0.96-1.00)สารสกัดหยาบของใบมะนาวแป้นใช้ตัวพาในระบบที่3และเฟสคงที่ คือซิลิกาเจล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

รูป 2.12 แถบสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* (บริเวณ R_f0.03 -0.06) จาก inhibit zone (บริเวณ R_f0.93-0.97)สารสกัดหยาบของใบมะนาวน้ำหอมใช้ตัวพาในระบบที่3 และเฟสคงที่ คือซิลิกาเจล

สารสกัดจากเปลือกผลของมะนาวแป้นและมะนาวน้ำหอมให้แถบR_f ในการต้านเชื้อรา เห็นผลไม่ชัดเจนจึงไม่นำมาแยกต่อ

ขูดเอาแถบสารในช่วง R_f ที่มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราของพืชแต่ละชนิดจำนวน 20เพลตแล้วนำซิลิกาเจลที่ขูดเก็บไว้มาละลายในตัวทำละลาย dichloromethane : methanol 50:50 โดยทำการสกัดหลายๆครั้งกรองเอาซิลิกาเจลออก เก็บสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออก แล้วนำสารสกัดมาศึกษาสารที่เป็นองค์ประกอบในแถบต้านเชื้อราโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

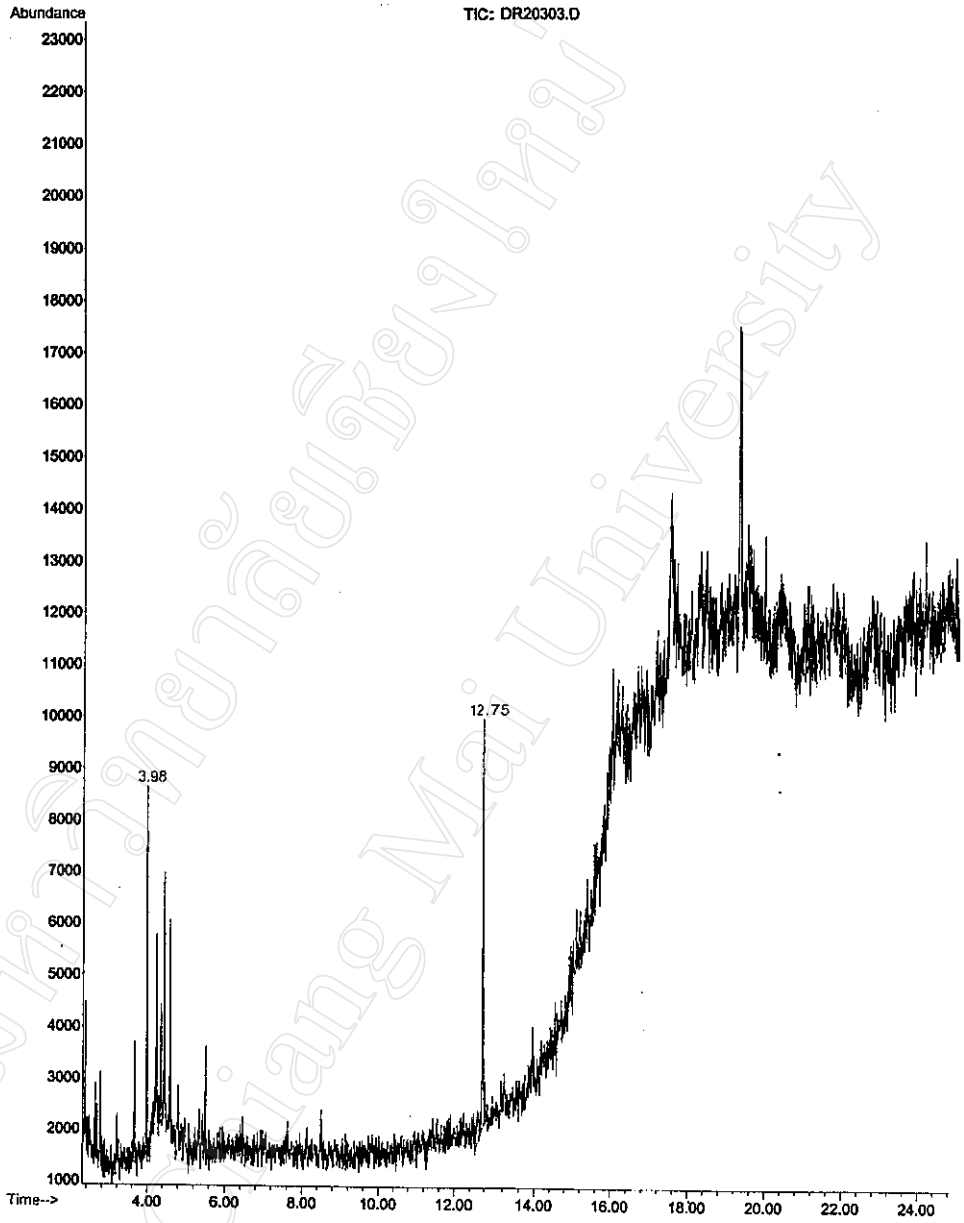
สภาวะที่ใช้มีดังนี้

Ion Source	
Ionization method	EI
Ionization voltage	70 eV
Temperature	250 $^{\circ}$ C
Analyzer rods	Hyperbolic quadrupole type

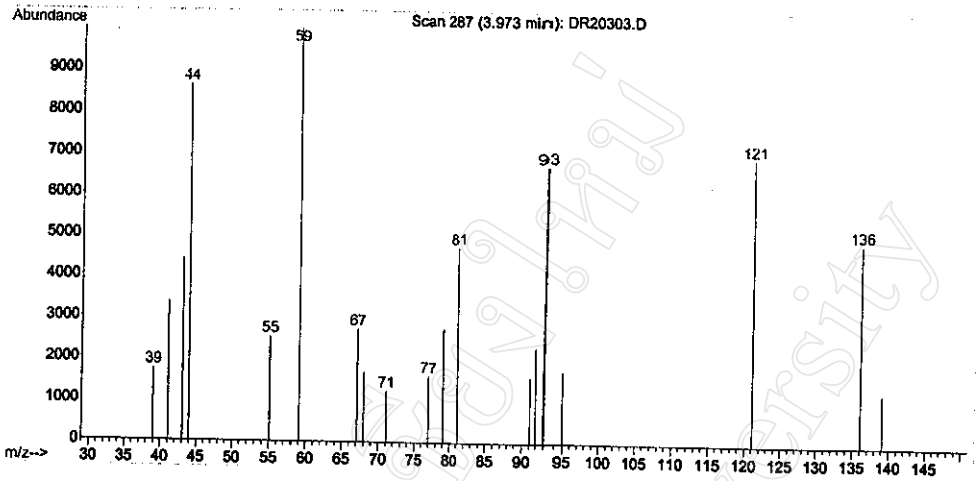
Sample inlet	
Split time	0.50 min
Carrier gas	He 0.8 kg/cm^2
Column	
Type	DB-1 (100% Dimethylpolysiloxane)
	J&W 122-1032
Length	30 m
ID	0.25 mm
Film thickness	0.25 μm
Temperature (^{o}C)	
Injecture	240
Detector	280
Initial Temp	120
Rate	80-180^{o} C อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 20^{o} C ต่อนาที และเพิ่มเป็น 180 -240 ^{o}Cอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ15 ^{o}C ต่อนาที
Final Temp	240
Final time	10 min

ผลการวิเคราะห์

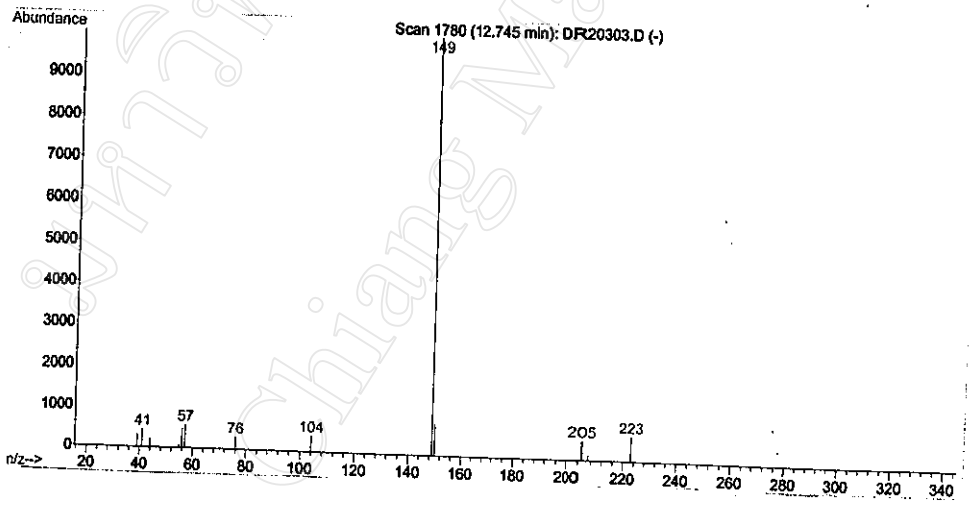
ผลการวิเคราะห์สารสกัดที่เป็นองค์ประกอบในแถบต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบของพืชแต่ละชนิดแสดงดังโครมาโตรแกรม และผลแมสสเปคตรัมดังรูป 2.13-2.31



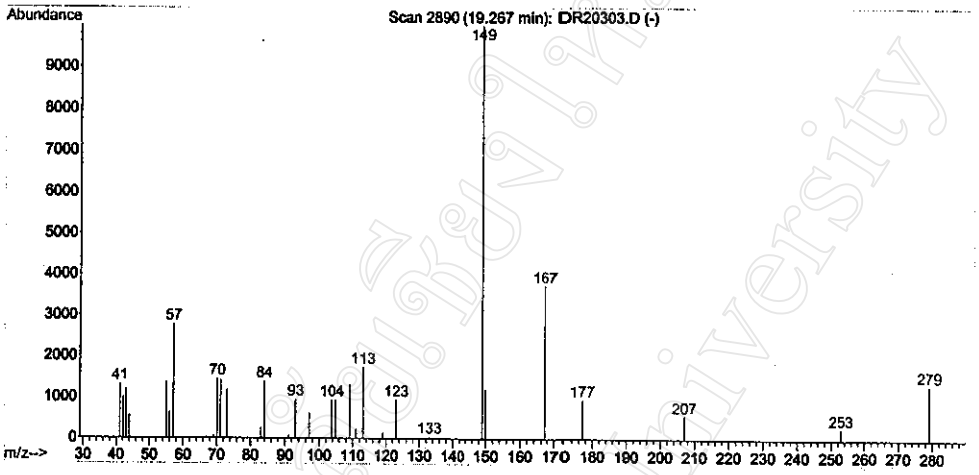
รูป2.13 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรที่ยับยั้งเชื้อราจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS



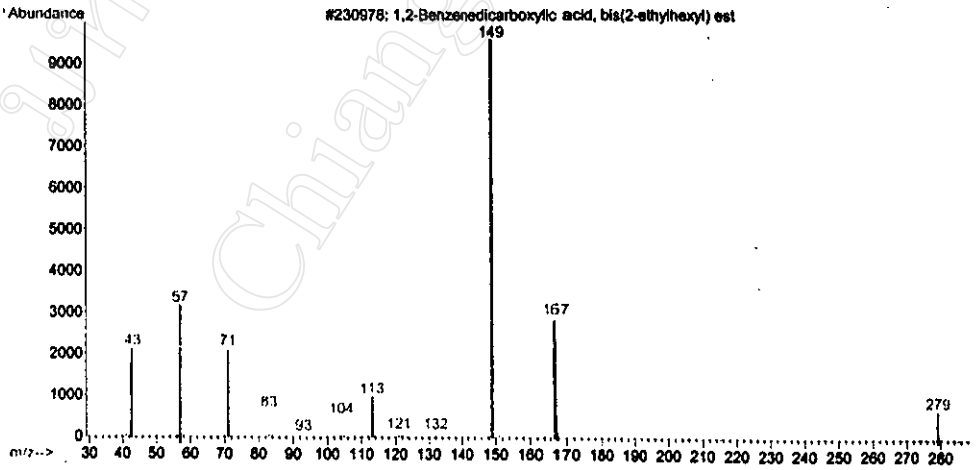
รูป2.14 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรที่ยับยั้งเชื้อราที่ t_r 3.98



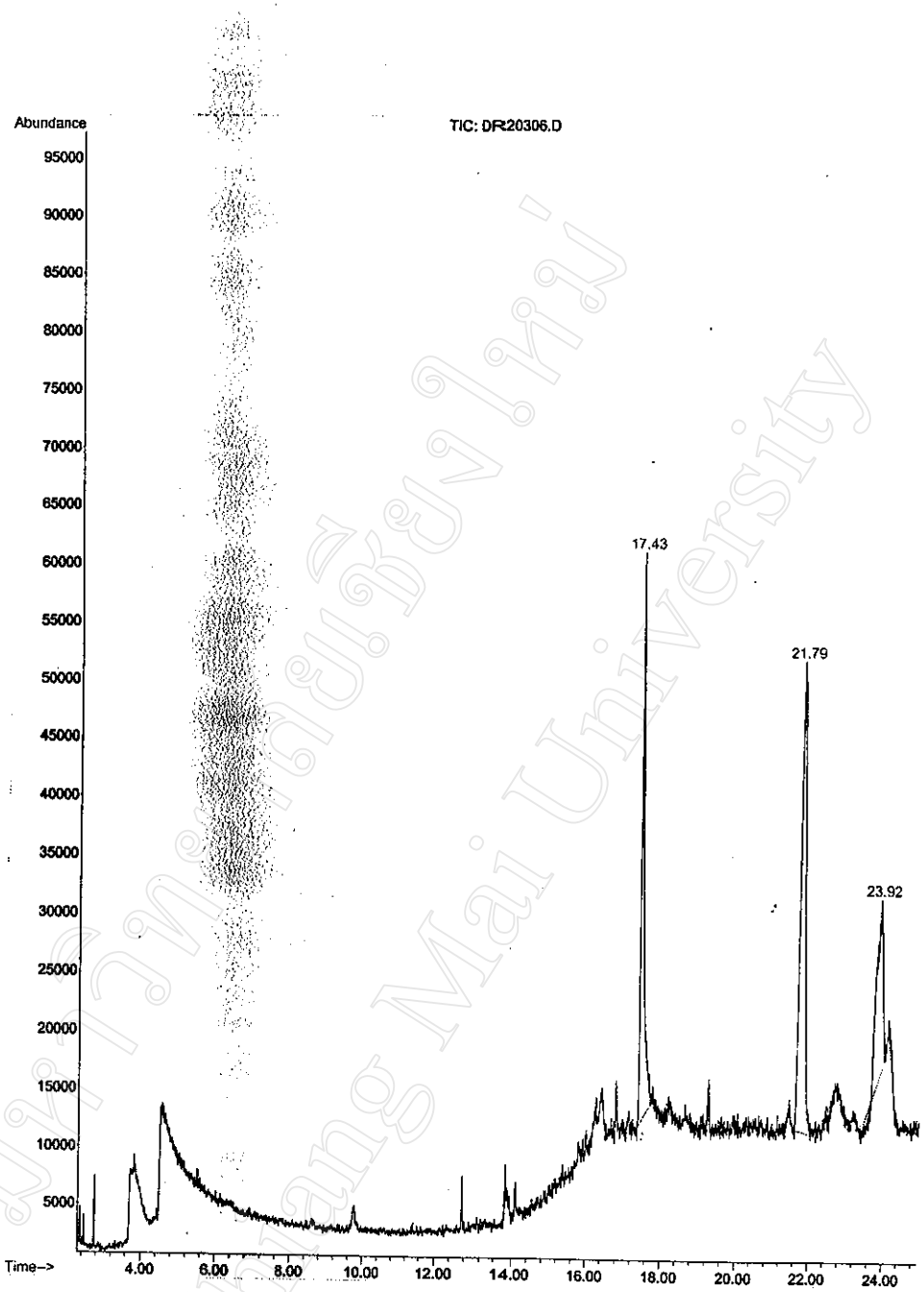
รูป2.15 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรที่ยับยั้งเชื้อราที่ t_r 12.74



Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality : 53
ID : 1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester (CAS) $$ Bis(2-ethylhexyl) phthalate $$ DOP $$ DEHP $$ DOF $$ DNOP $$ Octoil $

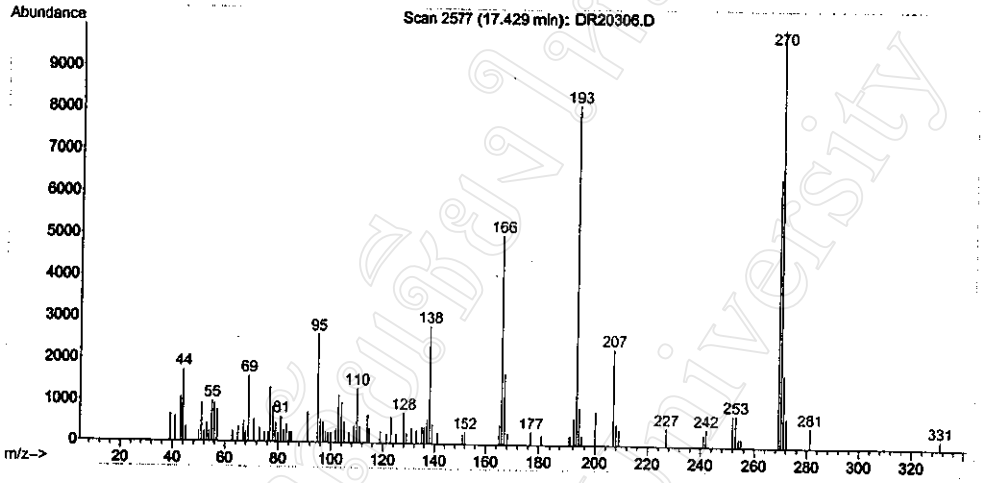


รูป2.16 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรที่ยับยั้งเชื้อราที่ t_r 19.27 เปรียบเทียบกับแมสสเปคตรัมของ Bis(2-ethylhexyl)phthalate ได้จาก database www.mse.gatech โดยมี %ID = 53%



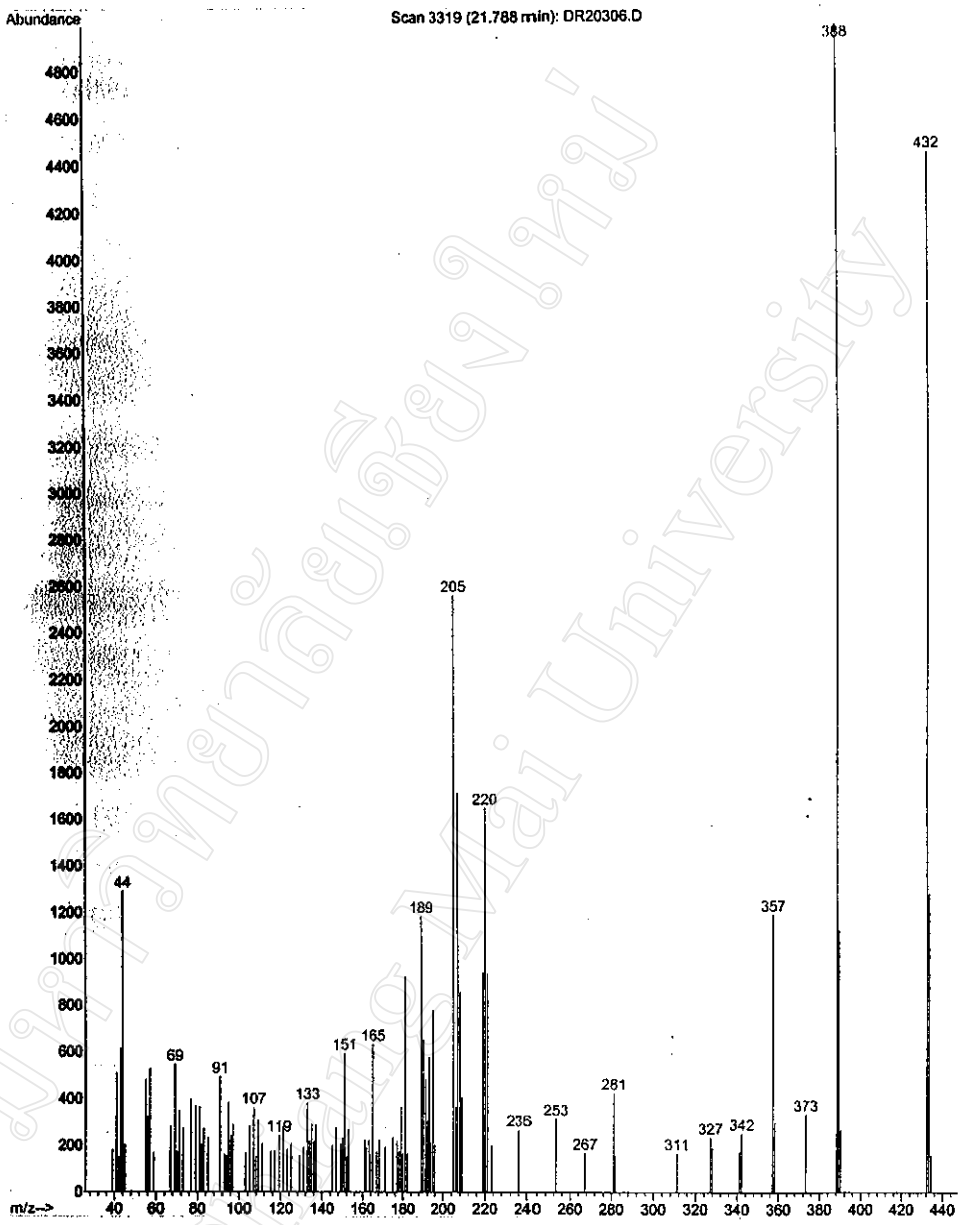
รูป2.17 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งเชื้อราจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

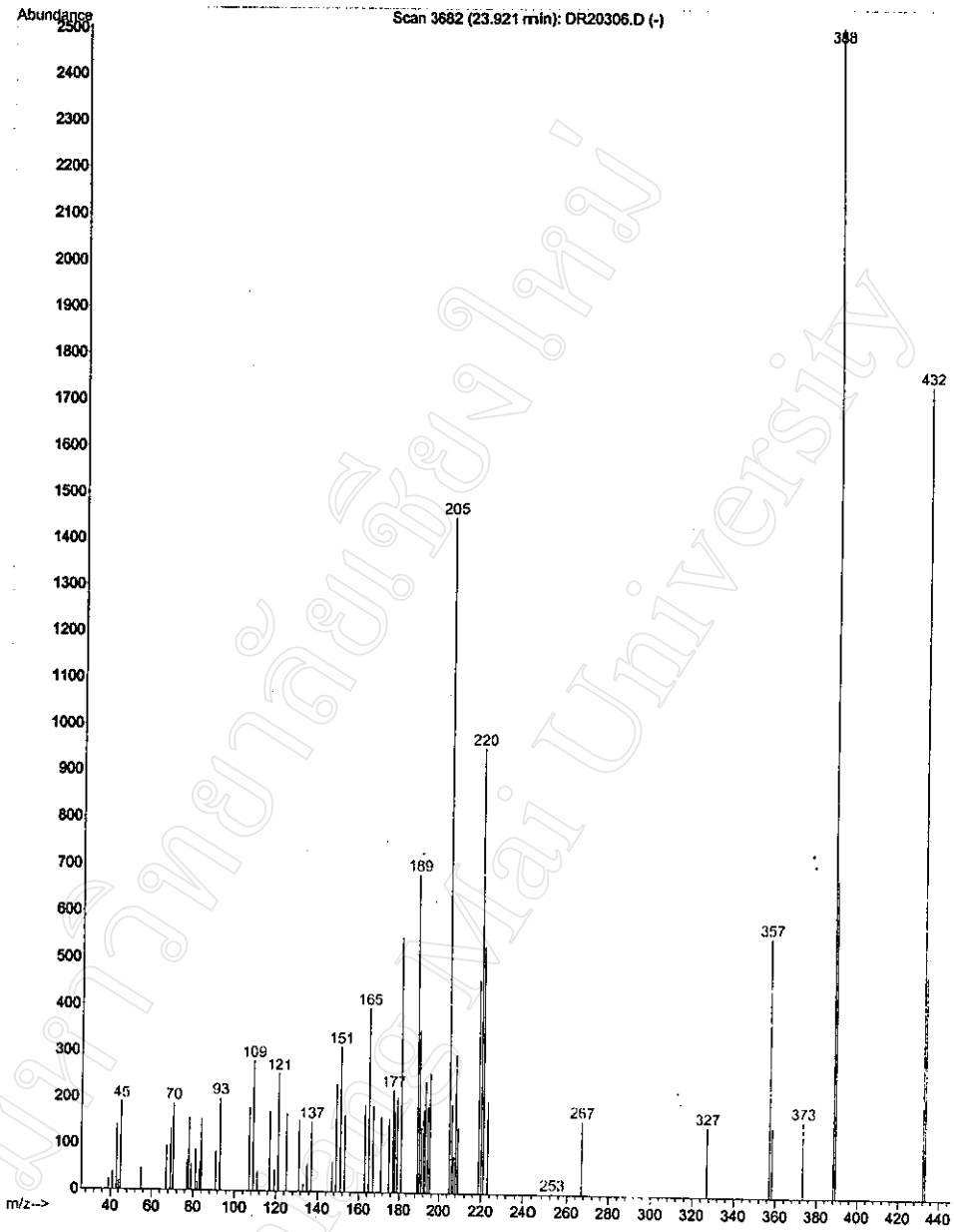


รูป 2.18 สเปคตรัมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งเชื้อราที่ t_r 17.43

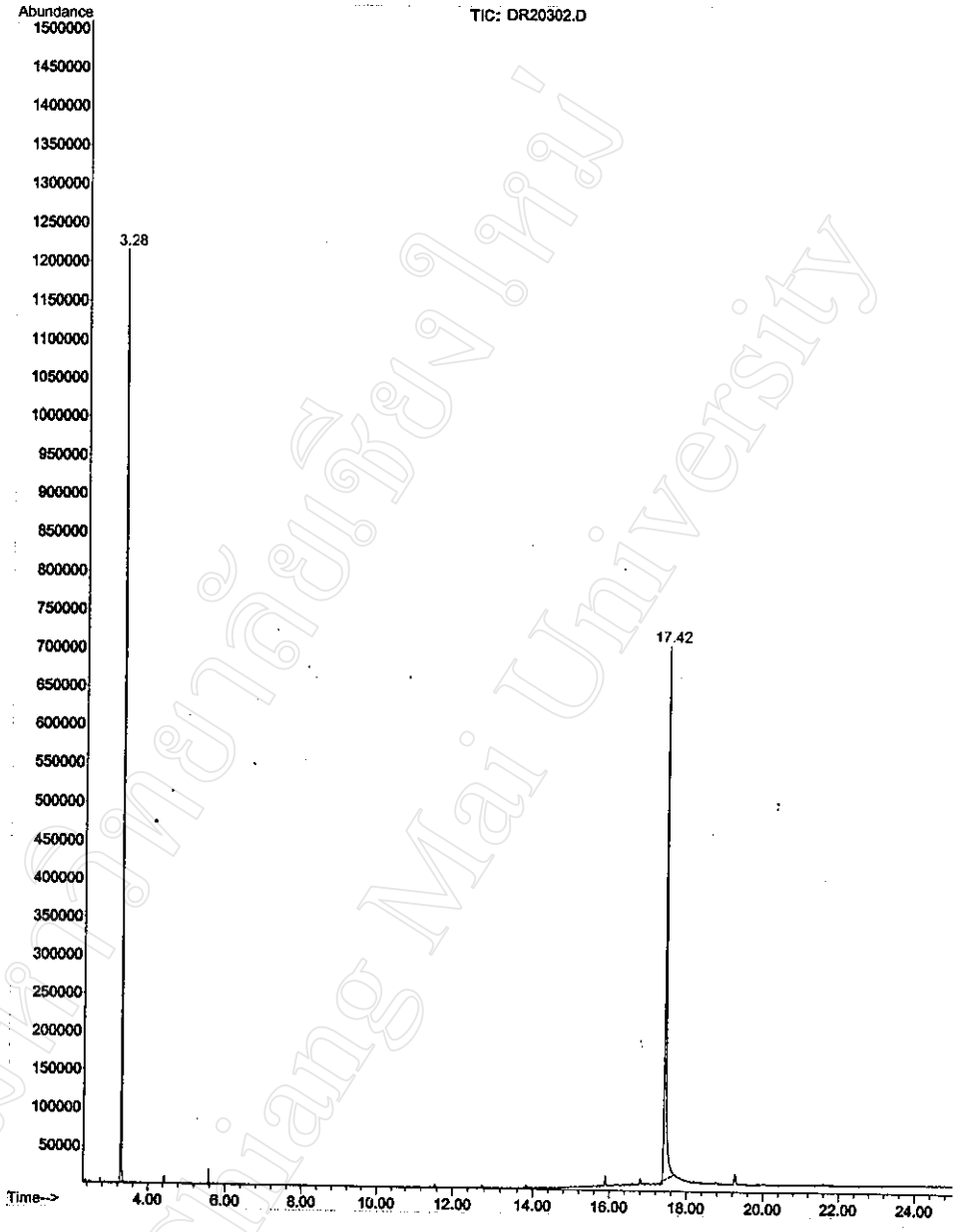
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



รูป2.19 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งเชื้อราที่ t_r 21.79

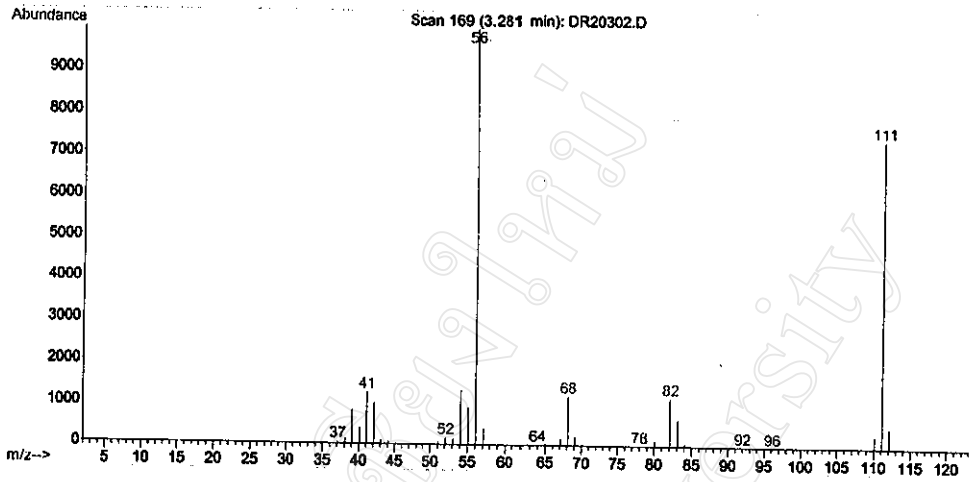


รูป2.20 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งเชื้อราที่ t_r 23.92



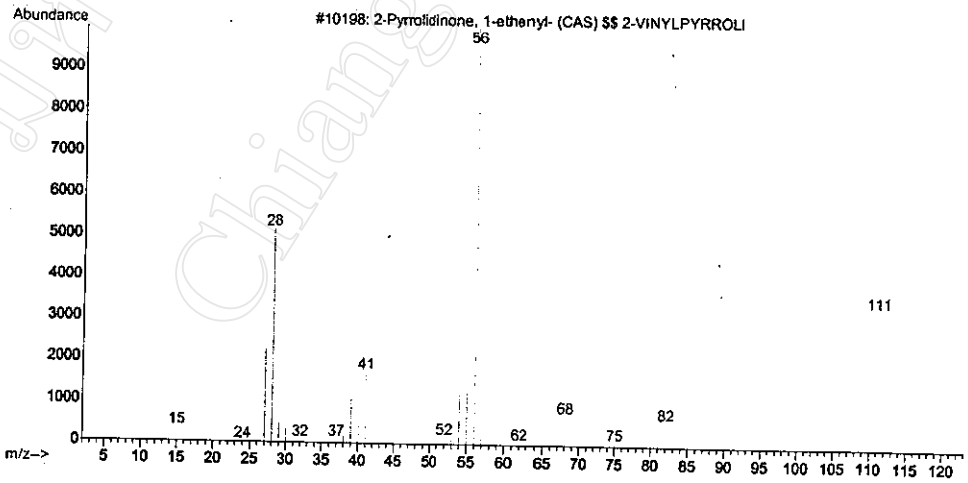
รูป2.21 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งเชื้อราจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

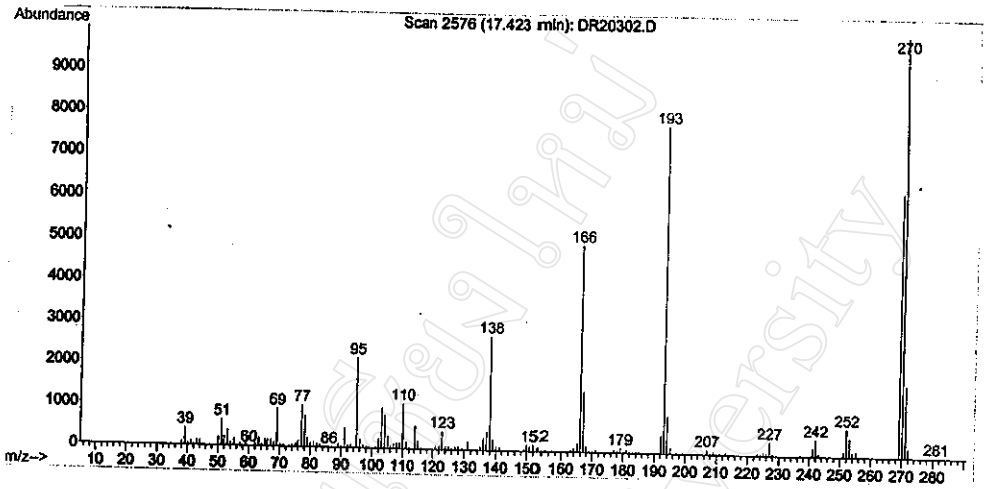


รูป2.22 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งเชื้อราที่ t_r 3.28

```
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality          : 91
ID               : 2-Pyrrolidinone, 1-ethenyl- (CAS) $$ 2-VINYLPYRROLIDONE $$ 1-Etheny
                   l-2-pyrrolidinone $$ N-Vinyl-2-pyrrolidone $$ Vinylpyrrolidone $$
```

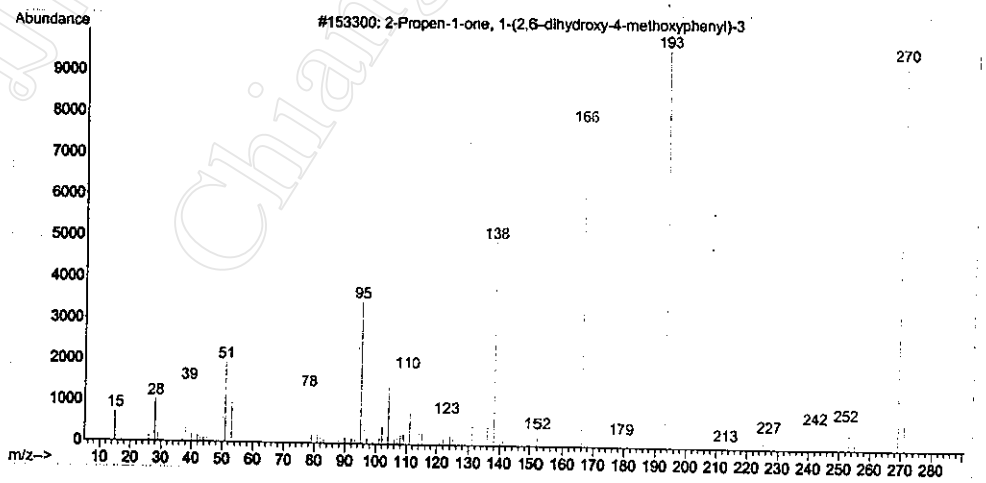


รูป2.23 แมสสเปคตรัมของ N-Vinyl-2-Pyrrolidone ได้จาก database www.mse.gatech โดยมี %ID = 91%

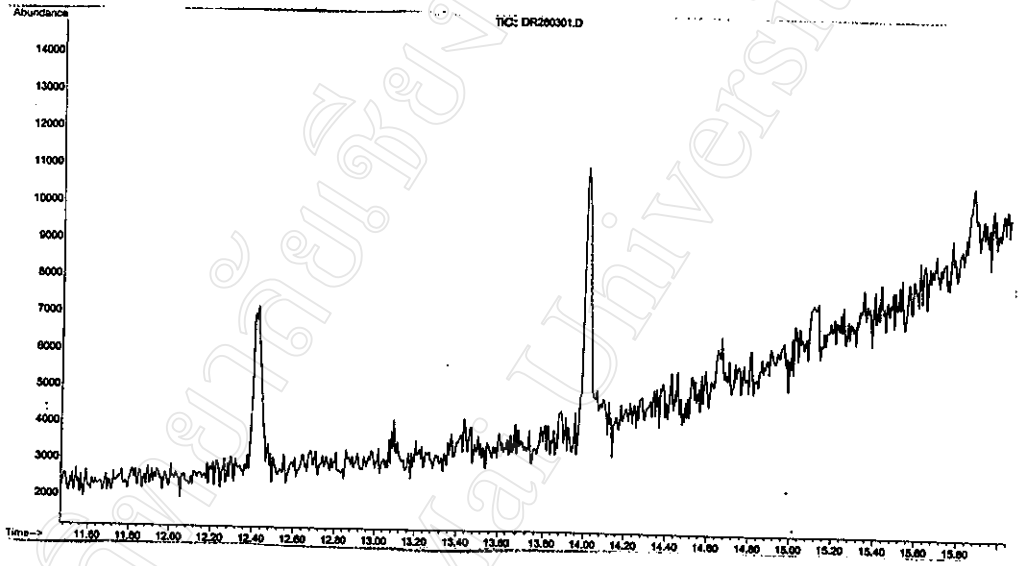


รูป2.24 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งเชื้อราที่ t_r 17.42

```
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality          : 99
ID               : 2-Propen-1-one, 1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-3-phenyl-, (E)-
                   CAS) $$ Pinostrobin chalcone $$ 2',6'-Dihydroxy-4'-methoxychalcon
```

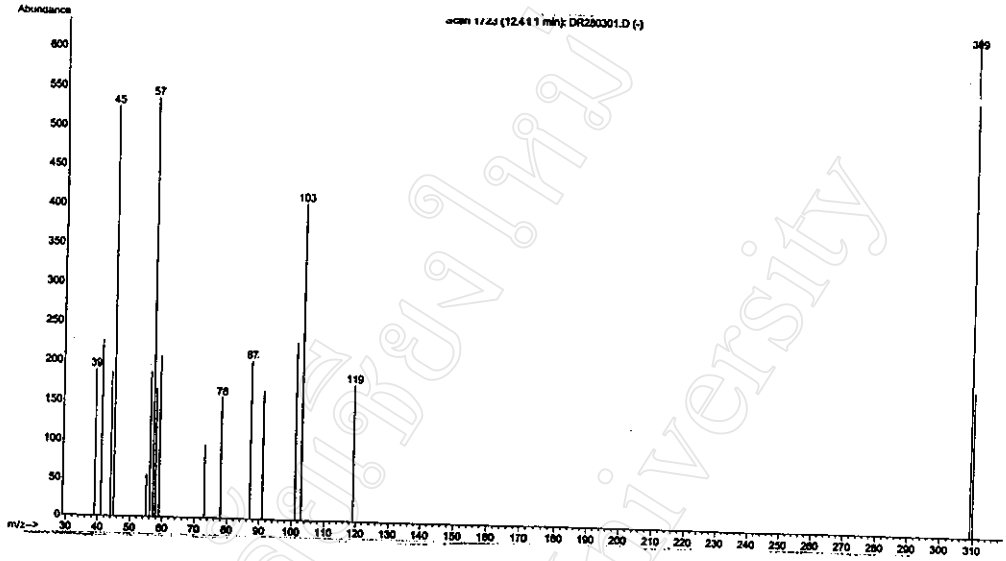


รูป2.25 แมสสเปคตรัมของ N-Vinyl-2-Pyrrolidone ได้จาก database www.mse.gatech โดยมี %ID = 91%

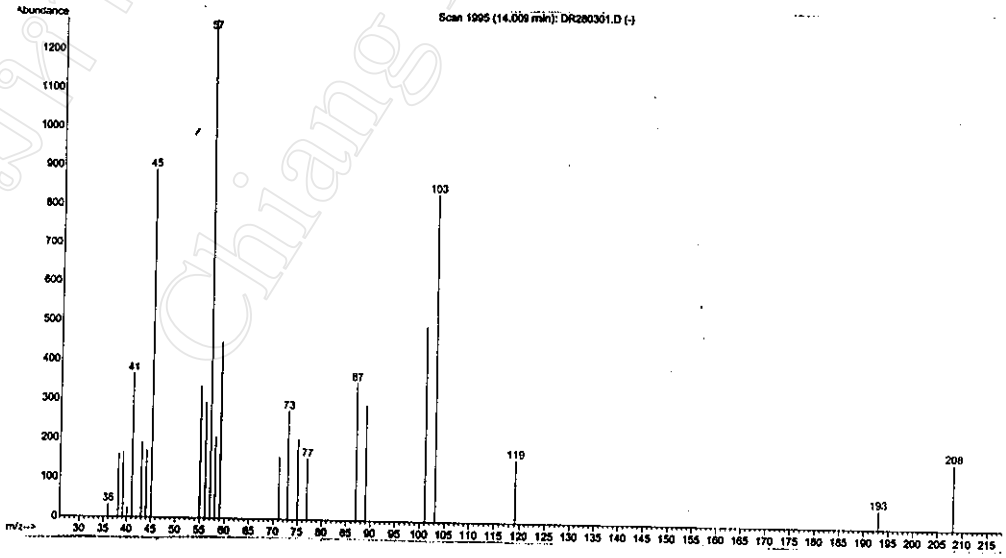


รูป2.26 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากใบมะนาวแป้นที่ยับยั้งเชื้อราจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

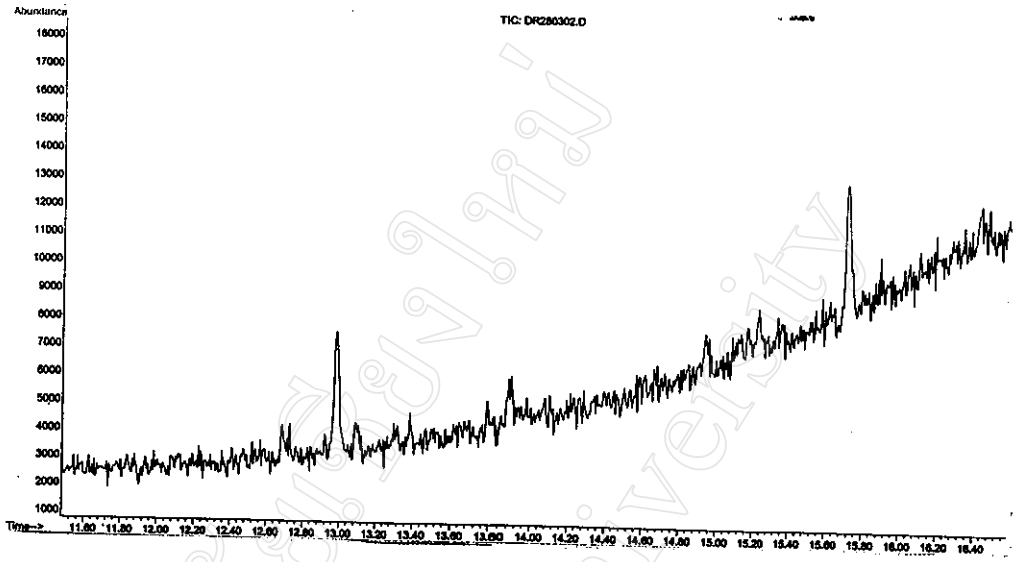
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



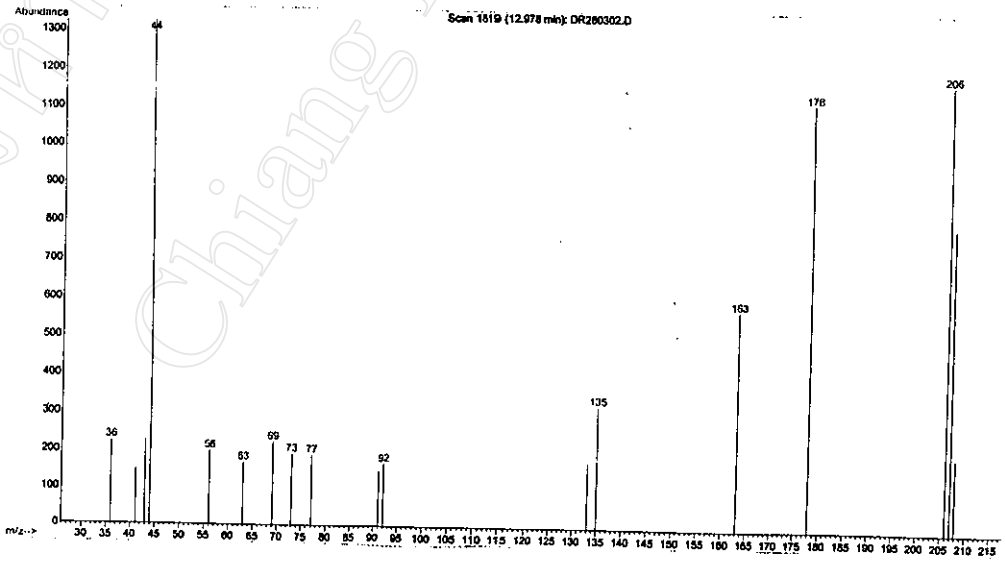
รูป2.27 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากใบมะนาวแป้นที่ยับยั้งเชื้อราที่ t_r 12.41



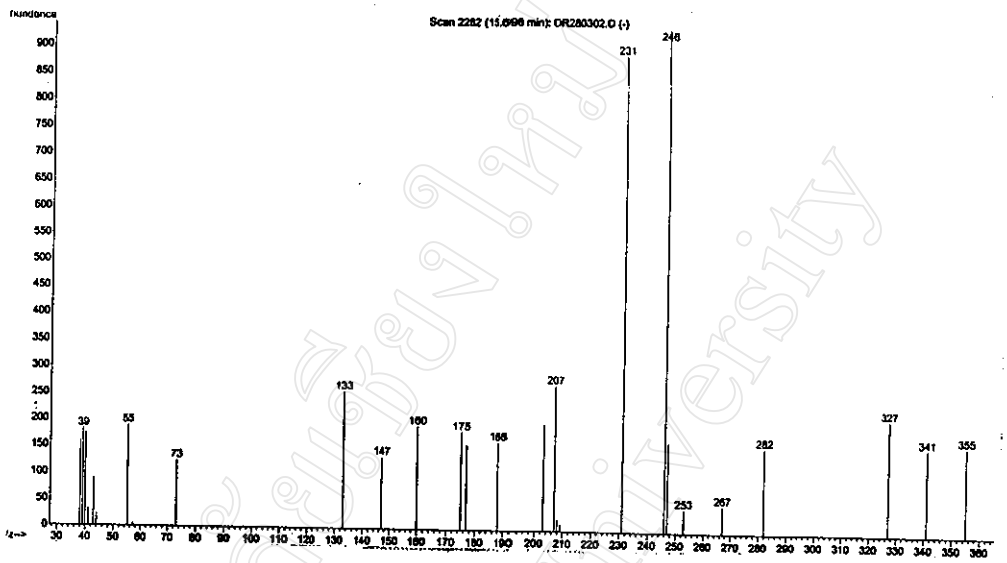
รูป2.28 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากใบมะนาวแป้นที่ยับยั้งเชื้อราที่ t_r 14.01



รูป2.29 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากใบมะนาวน้ำหอมที่ยับยั้งเชื้อราจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS



รูป2.30 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากใบมะนาวน้ำหอมที่ยับยั้งเชื้อราที่ t_r 12.98



รูป2.31 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากใบมะนาวน้ำหอมที่ยับยั้งเชื้อราที่ t_r 15.69

2.5.2.5การทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens*

การเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

สูตรอาหารเหลว NB

Beef extract	3 กรัม
Bacto peptone	5 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

สูตรอาหารแข็ง NA

Beef extract	3 กรัม
Bacto peptone	5 กรัม
ผงวุ้น	17 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ต้มน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตรให้ร้อน ใส่ Beef extract 3 กรัมและ Bacto peptone 5 กรัมลงไป คนจนละลายหมดนำขึ้นตั้งไฟอุ่นจนสารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็นเติมผงวุ้น 17 กรัม ลงไป (ในการทำ NB ไม่ต้องเติมผงวุ้นลงไป) ต้มต่อไปจนเดือดรอให้เย็นลงแล้วจึงตักใส่ขวดขวดละ 100 มิลลิลิตร

ปิดจุกขวดด้วยสำลีแล้วใช้กระดาษปิดทับมัดด้วยยางรัดให้แน่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ° C นาน 20 นาที

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens*

ทำเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อรา แต่ไม่ต้องหยดกรดแลคติกลงไปขณะที่เท NA และประมาณ 1วันก็จะมีเชื้อแบคทีเรียเกิดขึ้น

การเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens*

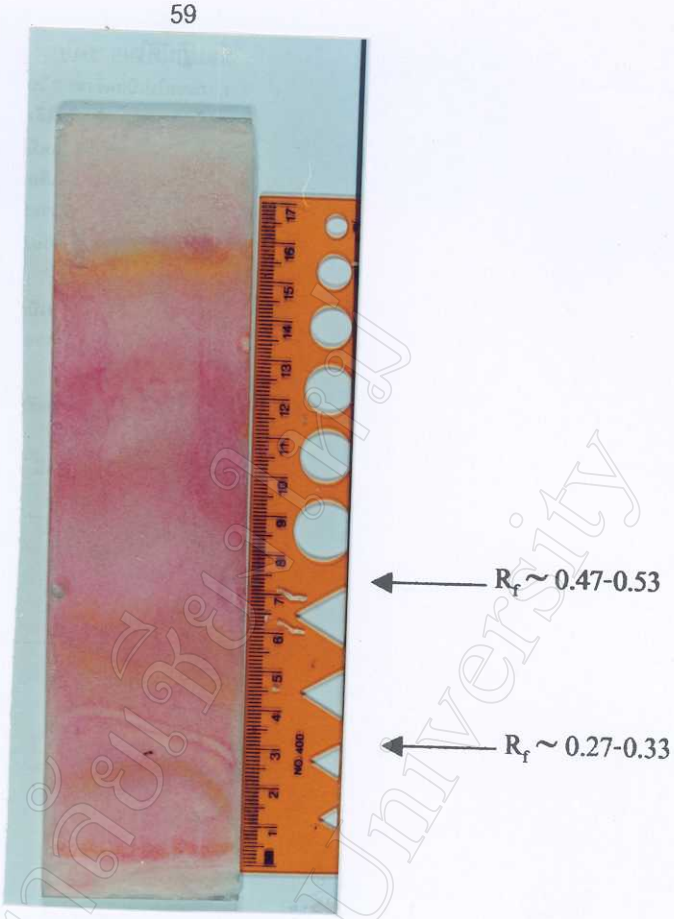
ทำเช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายแขวนลอยสปอร์เชื้อรา แต่ใช้แบคทีเรียอายุ 2 วัน

การเตรียมกล่องบ่มเชื้อ

ล้างกล่องพลาสติกที่ใช้เป็นกล่องบ่มเชื้อให้สะอาด เมื่อแห้งแล้วให้เช็ดทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์เพื่อฆ่าเชื้อ รอให้แห้งบุกล่องด้วยกระดาษทิชชูและพ่นน้ำกลั่นให้ทั่วปิดฝาทิ้งไว้เพื่อให้ไอน้ำอิ่มตัว

ผลทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* ของสารสกัดจากใบฟ้าทะลายโจร หัวกระชาย ใบและเปลือกมะนาวแป้น ใบและเปลือกของมะนาวน้ำหอม

นำแผ่น TLCที่ได้มาสเปร์แบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB แล้วนำใส่ในกล่องบ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบกำหนดปรากฏมีเพียงสารสกัดจากกระชายที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* โดยได้แถบที่ต้านแบคทีเรียดังแสดงในรูป 2.32

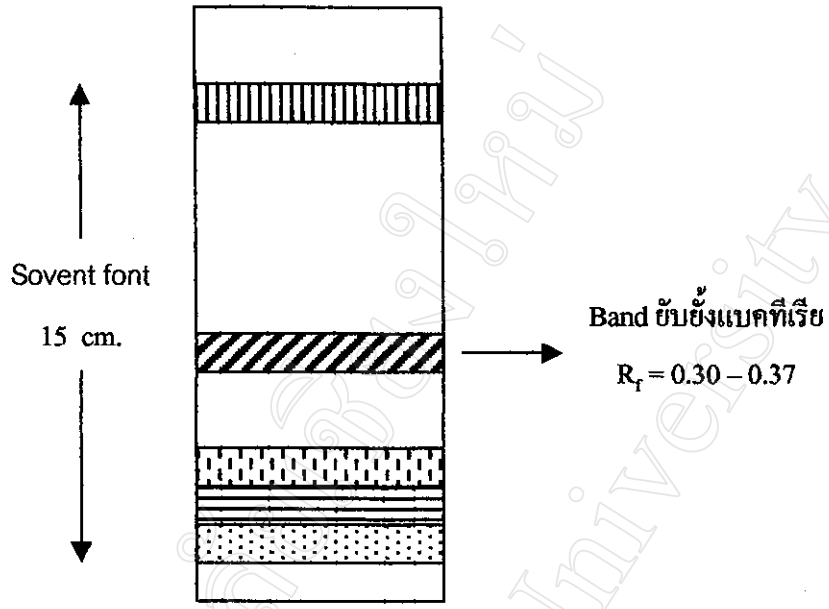


รูป 2.32 แถบสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Serratia marcescens* จากสารสกัดหยาบของกระชายใช้ตัวพาในระบบที่4 และเฟสคงที่ คือ ซิลิกาเจล

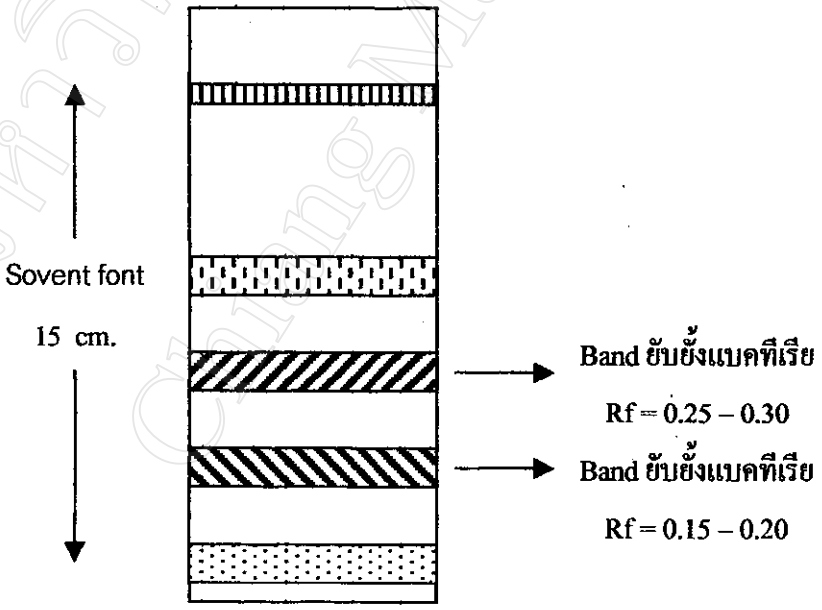
การแยกสารบริเวณที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากซิลิกาเจล

ขูดเอาแถบสารในช่วง R_f ที่มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของพืชแต่ละชนิด จำนวน 60เพลตแล้วนำซิลิกาเจลที่มี R_f เท่ากันมารวมกันและสกัดด้วย dichloromethane : methanol 50:50 โดยทำการสกัดหลายๆครั้งกรองเอาซิลิกาเจลออก เก็บสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำแล้วนำไปทำ โครมาโตรกราฟีผิวบางอีกครั้งโดยชะด้วยตัวพาในระบบที่4 หลังจากนั้นทดสอบด้วยการพ่นสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียลงบนเพลต

เมื่อพ่นสารละลายแขวนลอยของสปอร์เชื้อราพบว่าพืชแต่ละชนิดเกิดแถบยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ดังรูป 2.33 และ2.34



รูป 2.33 แถบสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Serratia marcescens* จาก inhibit zone ของกระชายที่ R_f 0.27-0.33 ใช้ตัวพาในระบบที่4 และเฟสคงที่ คือ ซิลิกาเจล



รูป 2.34 แถบสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Serratia marcescens* จาก inhibit zone ของกระชายที่ R_f0.47-0.53 ใช้ตัวพาในระบบที่4 และเฟสคงที่ คือ ซิลิกาเจล

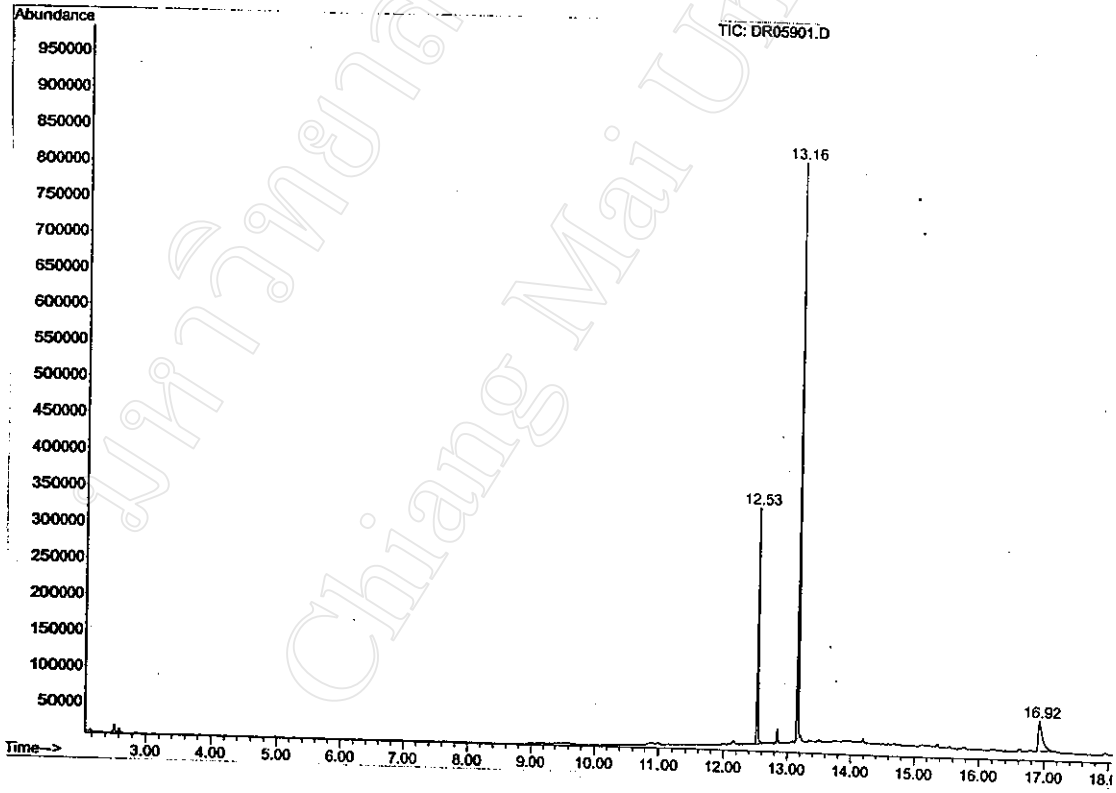
ขูดเอาแถบสารในช่วง R_f ที่มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของกระชายจำนวน 20เพลตแล้วนำซิลิกาเจลที่ขูดเก็บไว้มาสกัดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane : methanol 50:50 โดยทำการสกัดหลายๆครั้งกรองเอาซิลิกาเจลออก เก็บสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออก แล้วนำสารสกัดมาศึกษาสารที่เป็นองค์ประกอบในแถบต้านแบคทีเรีย โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

สภาวะที่ใช้มีดังนี้

Ion Source	
Ionization method	EI
Ionization voltage	70 eV
Temperature	250 ° C
Analyzer rods	Hyperbolic quadrupole type
Sample inlet	
Split time	0.50 min
Carrier gas	He 0.8 kg/cm^2
Column	
Type	DB-1 (100% Dimethylpolysiloxane)
	J&W 122-1032
Length	30 m
ID	0.25 mm
Film thickness	0.25 μm
Temperature (° C)	
Injecture	240
Detector	280
Initial Temp	120
Rate	80-180° C อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 20 ° C ต่อนาที และเพิ่มเป็น 180 -240 °Cอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ15 °C ต่อนาที
Final Temp	240
Final time	10 min

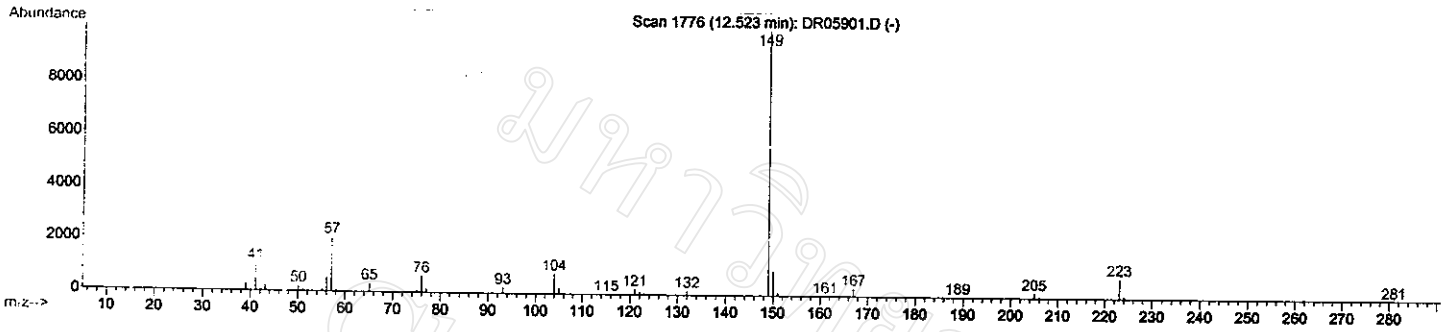
ผลการวิเคราะห์

ผลการวิเคราะห์สารสกัดที่เป็นองค์ประกอบในแถบต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากกระชาย แสดงดังโครมาโตรแกรม และผลแมสสเปคตรัมดังรูป 2.35-2.61



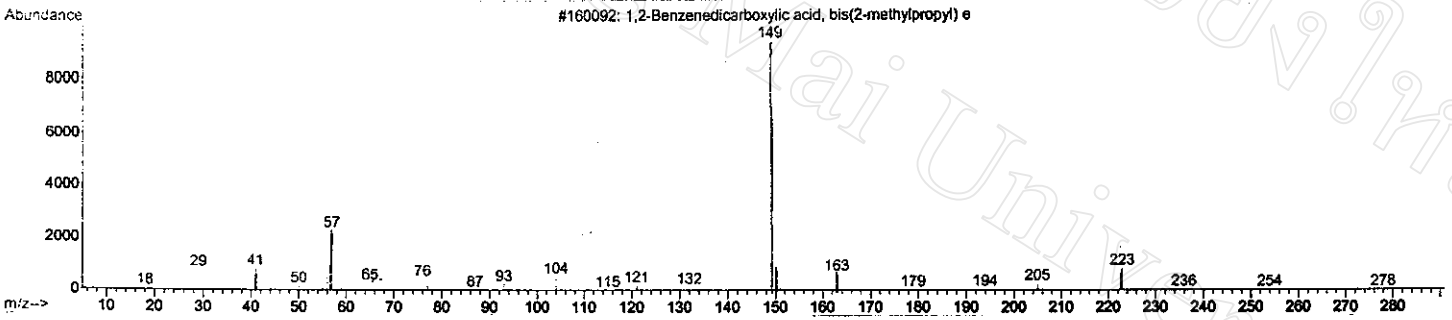
รูป2.35 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ R_f = 0.30-0.37 (รูปที่ 2.33)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



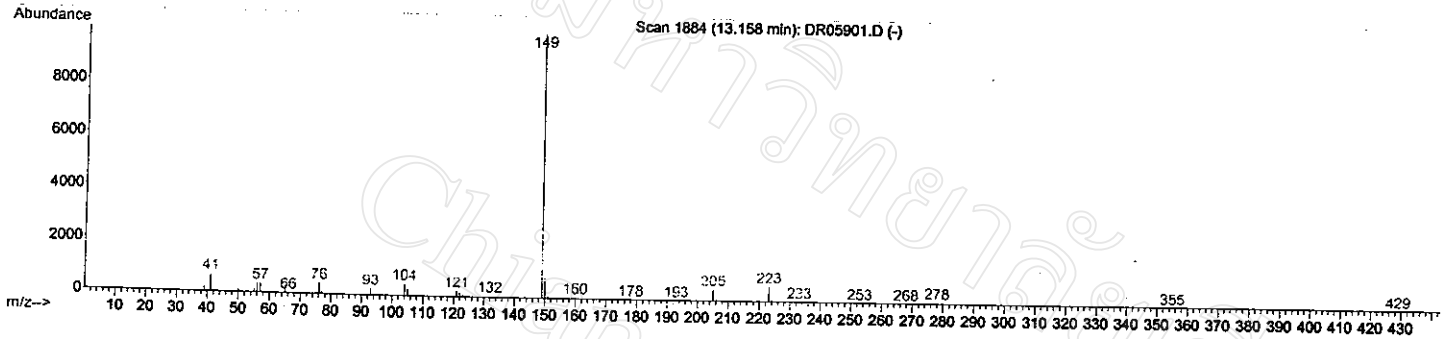
รูป 2.36 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ t_r 12.53

```
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality          : 90
ID               : 1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester (CAS) $$ Isobutyl phthalate $$ ISOBUTYL O-PHTHALATE $
                   $ DI-ISOBUTYL PHTHALATE
```



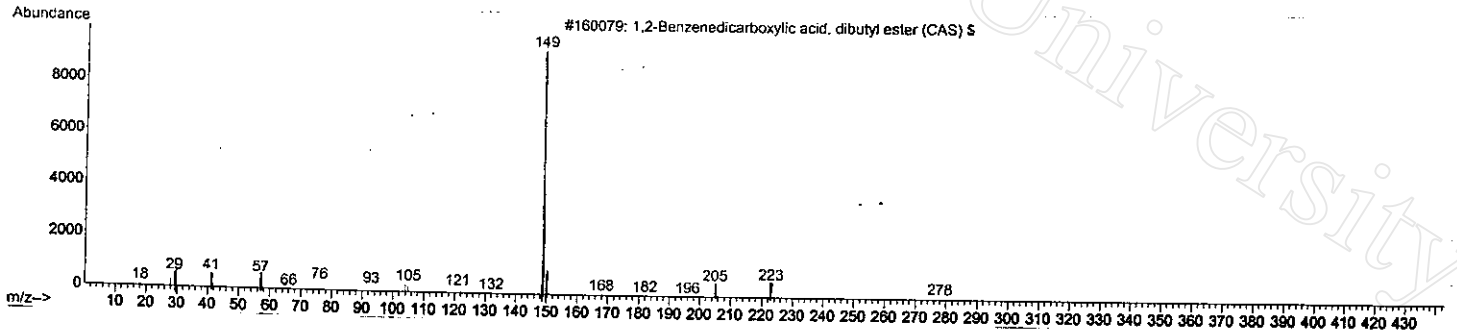
รูป2.37 แมสสเปคตรัมของ Isobutyl phthalate ได้จาก database www.mse.gatech โดยมี %ID = 90

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



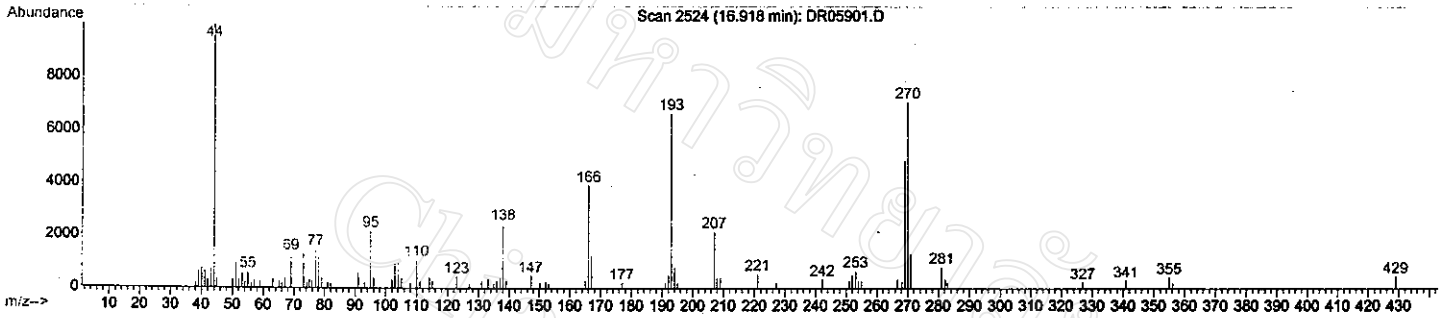
รูป 2.38 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ t_r 13.16

```
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality          : 96
ID               : 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester (CAS) $$ Butyl phthalate $$ DI-N-BUTYLPHTHALATE $$ PX 104 $$ DIBU
                   TYLPHTALATE $$ DIBUTYL-
```

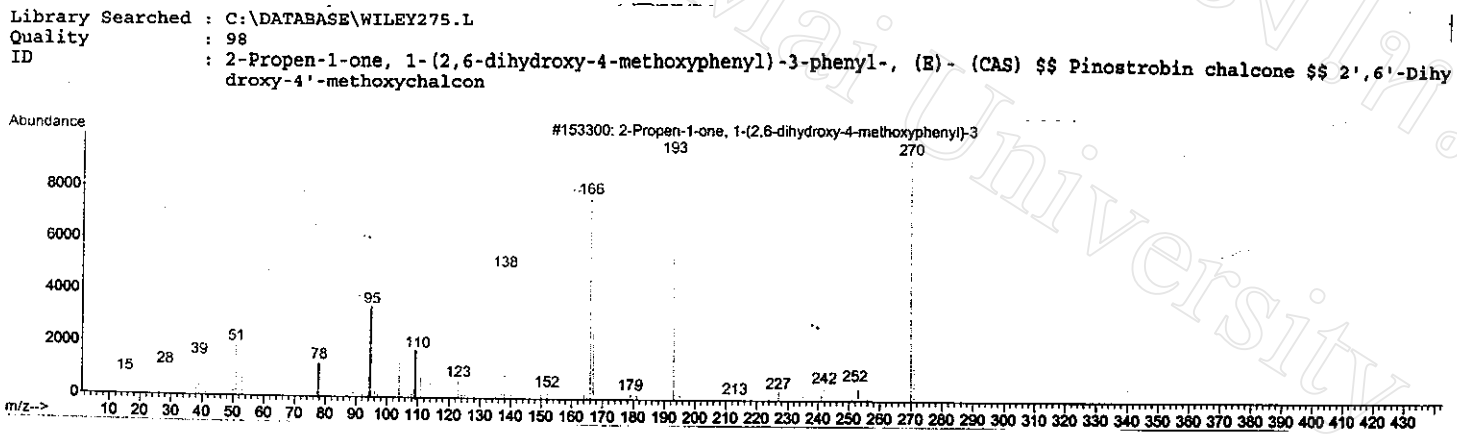


รูป2.39 แมสสเปคตรัมของ Butyl phthalate ได้จาก database www.mse.gatech โดยมี %ID = 96

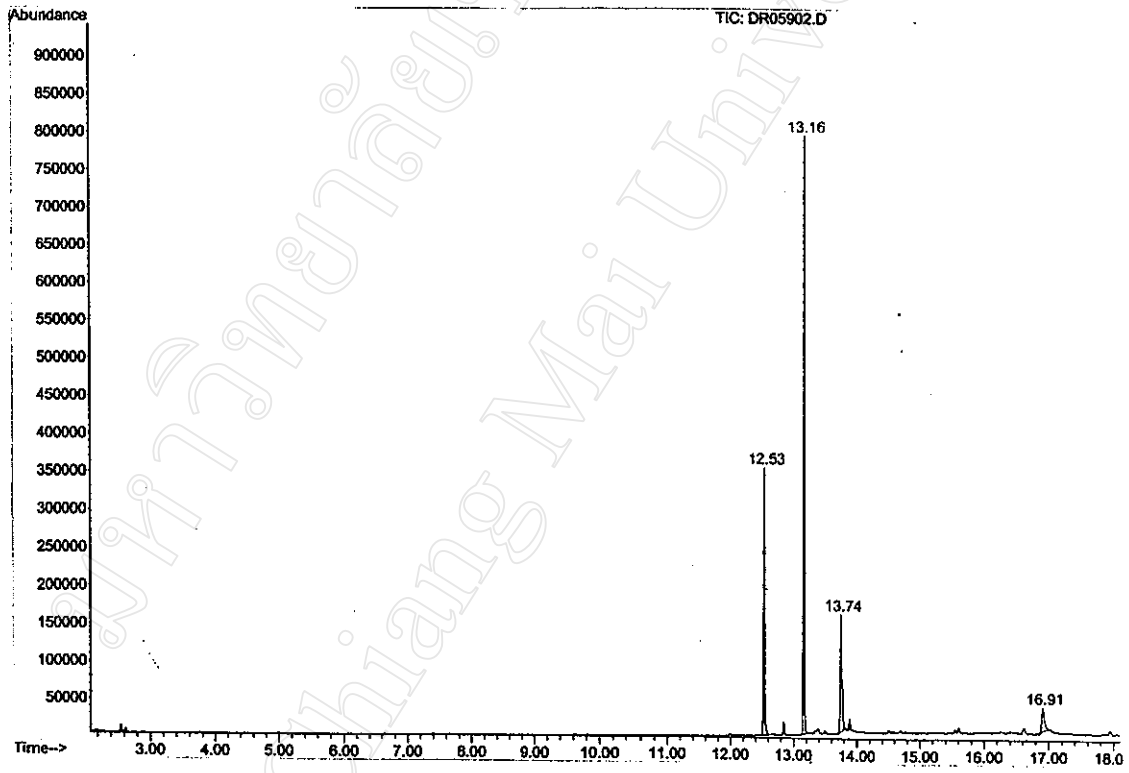
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



รูป 2.40 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ t_r 16.92

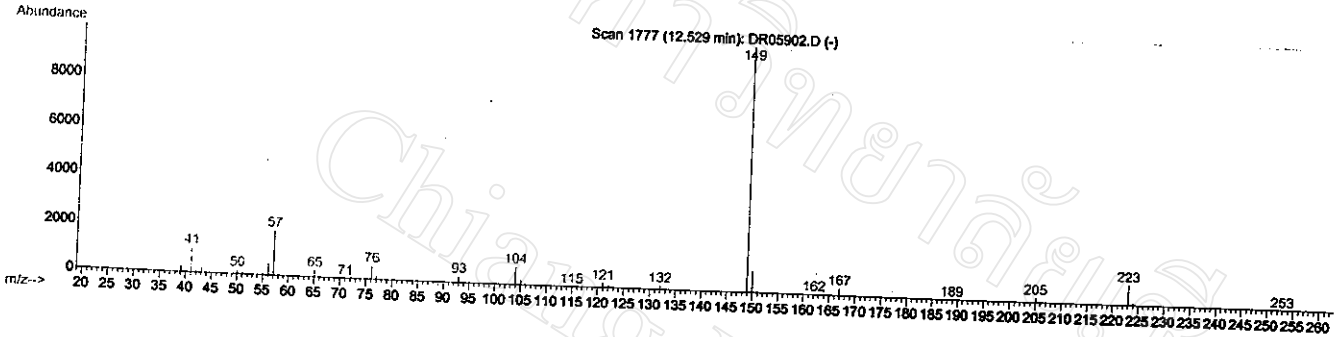


รูป2.41 แมสสเปคตรัมของ Pinostrobin chalcone ได้จาก database www.mse.gatech โดยมี %ID = 98

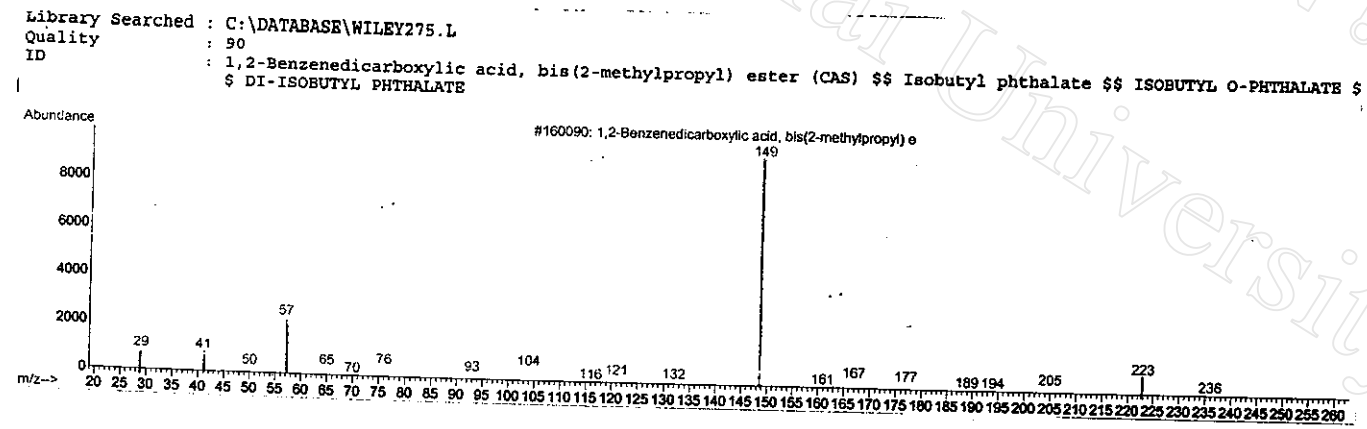


รูป2.42 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากกระชายที่ R_f = 0.15-0.20 (รูปที่ 2.34)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

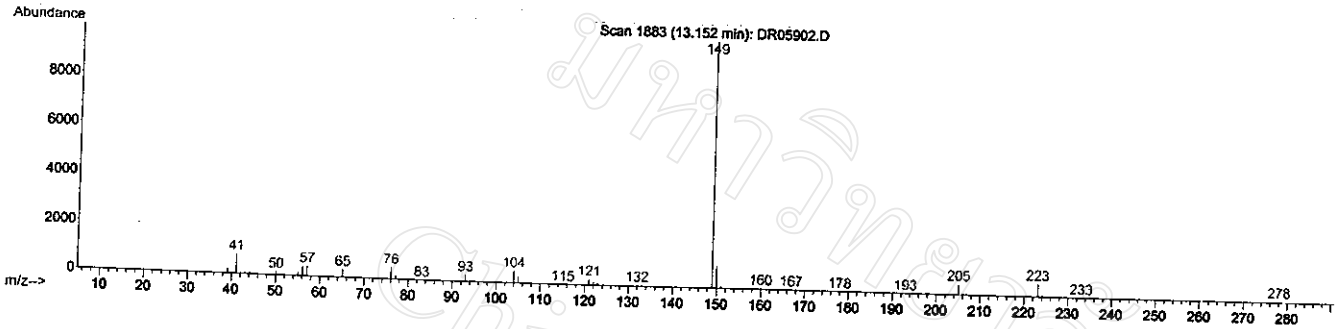


รูป 2.43 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ t_r 12.53

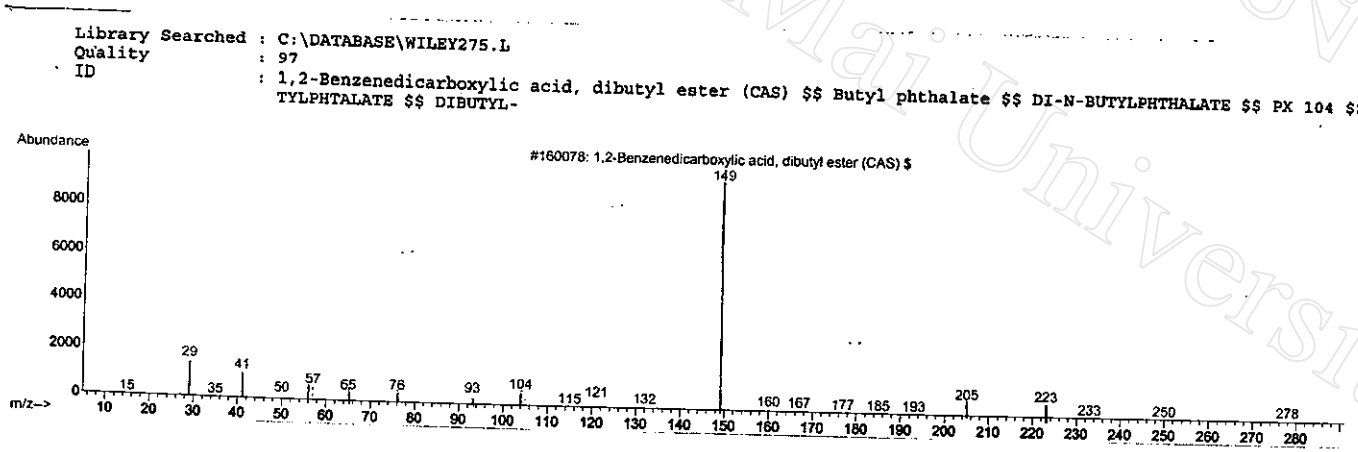


รูป2.44 แมสสเปคตรัมของ Isobutyl phthalate ได้จาก database www.mse.gatech โดยมี %ID = 90

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

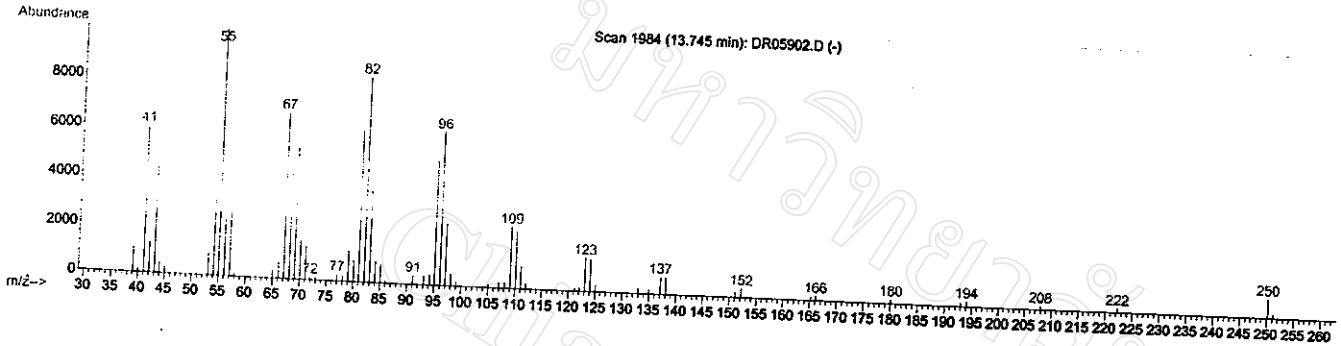


รูป 2.45 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ t_r 13.16

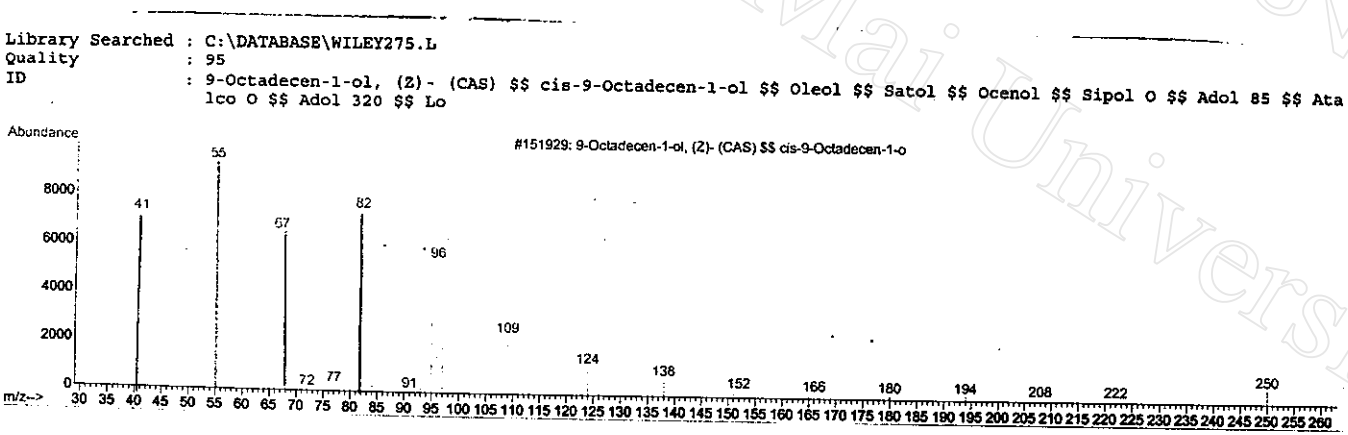


รูป2.46 แมสสเปคตรัมของ butyl phthalate ได้จาก database www.mse.gatech โดยมี %ID = 97

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

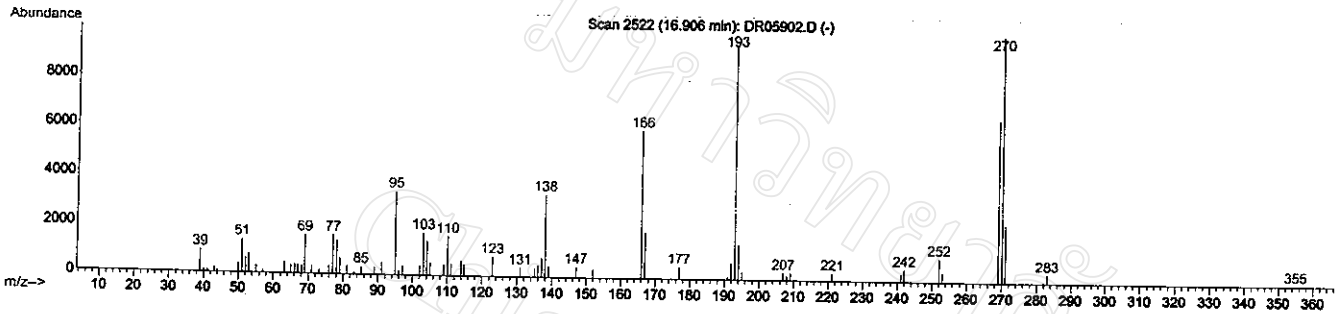


รูป 2.47 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ t_r 13.74



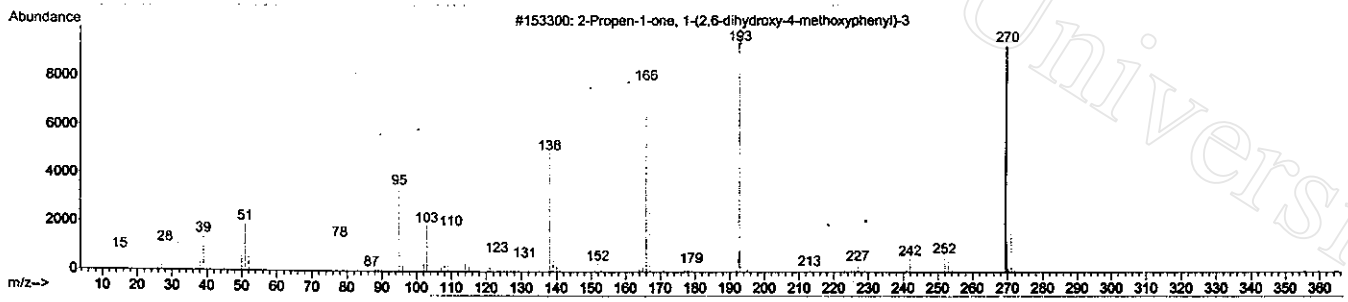
รูป2.48 แมสสเปคตรัมของ cis-9-Octadecen-1-ol ได้จาก database www.mse.gatech โดยมี %ID = 95

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



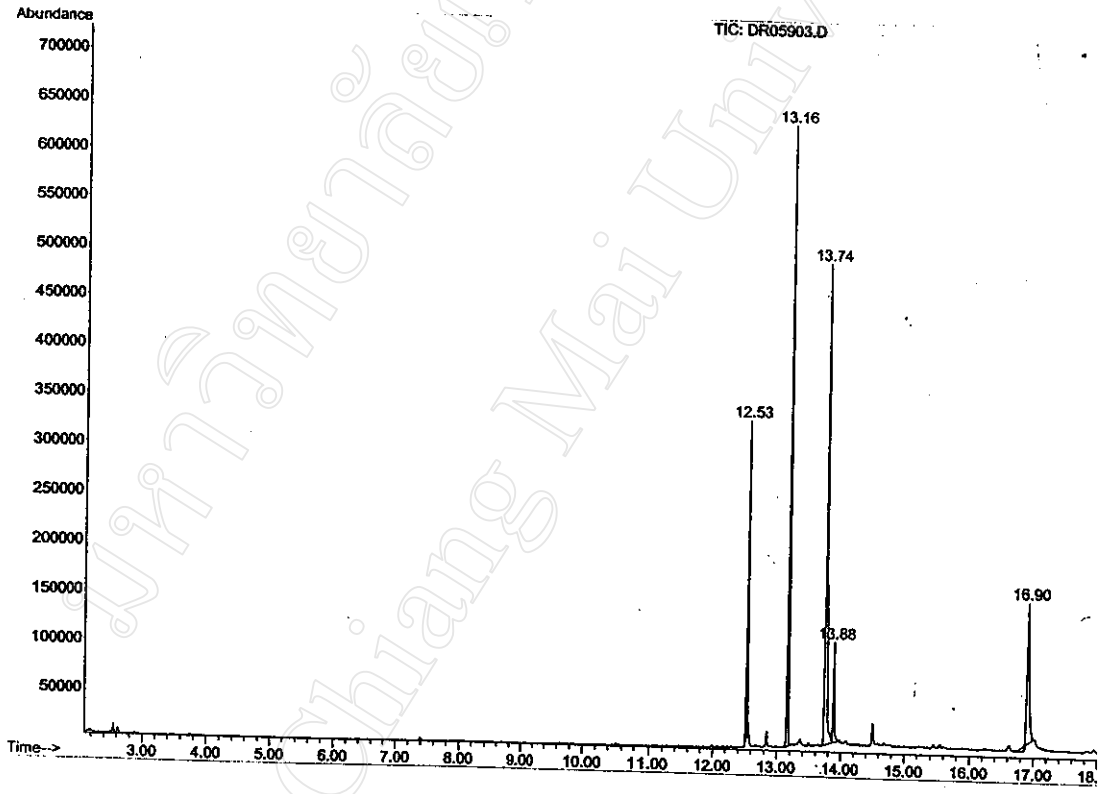
รูป 2.49 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ t_r 16.91


```
Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L
Quality          : 98
ID               : 2-Propen-1-one, 1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-3-phenyl-, (E)- (CAS) $$ Pinostrobin chalcone $$ 2',6'-Dihy
                   droxy-4'-methoxychalcon
```



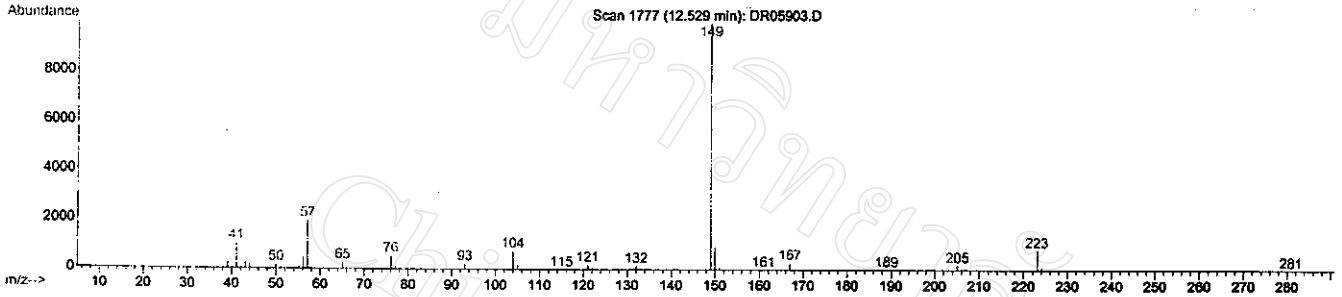
รูป2.50 แมสสเปคตรัมของ Pinostrobin chalcone ได้จาก database www.mse.gatech โดยมี %ID = 98

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

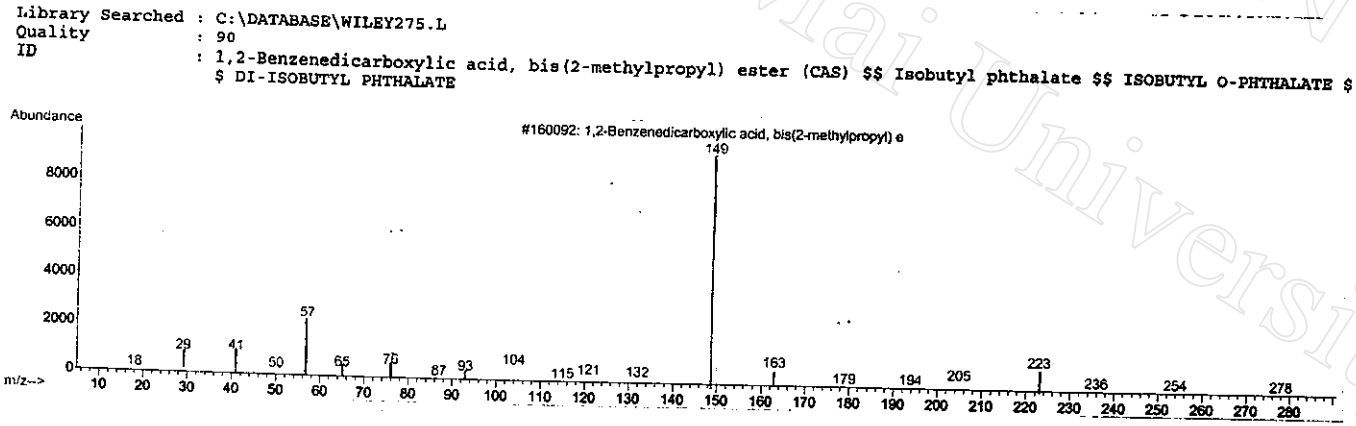


รูป2.51 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากกระชายที่ R_f = 0.25-0.30 (รูปที่ 2.34)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

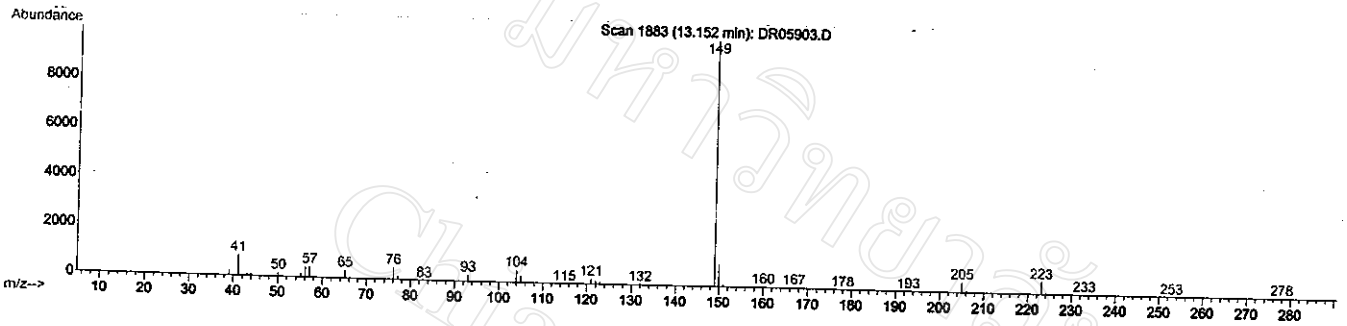


รูป 2.52 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ t_r 12.53

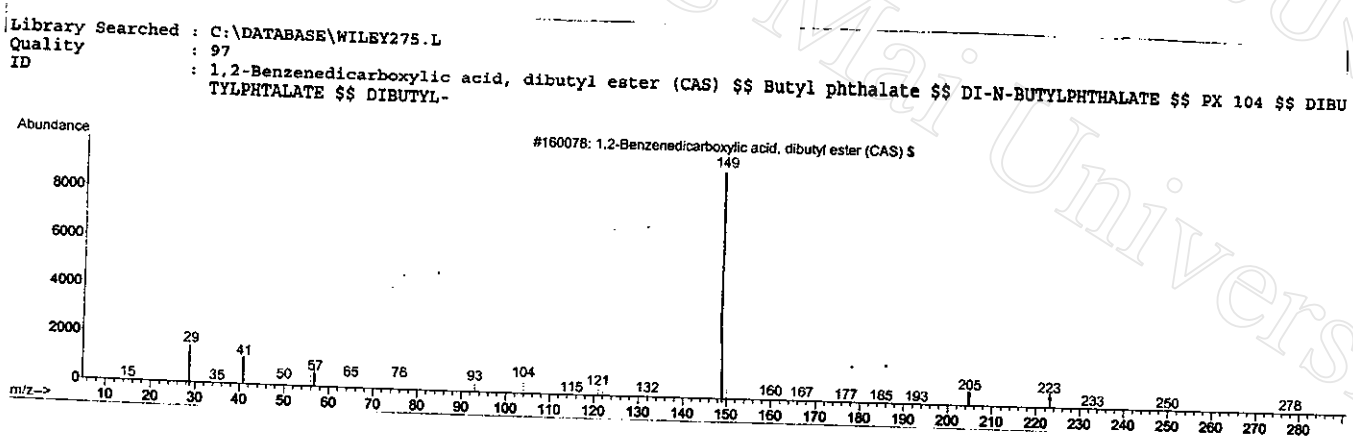


รูป2.53 แมสสเปคตรัมของ Isobutyl phthalate ได้จาก database www.mse.gatech โดยมี %ID = 90

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

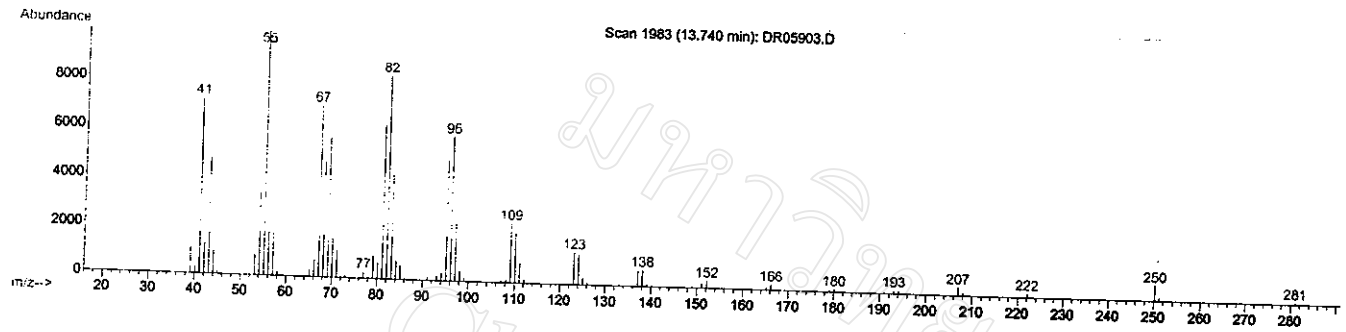


รูป 2.54 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ t_r 13.61

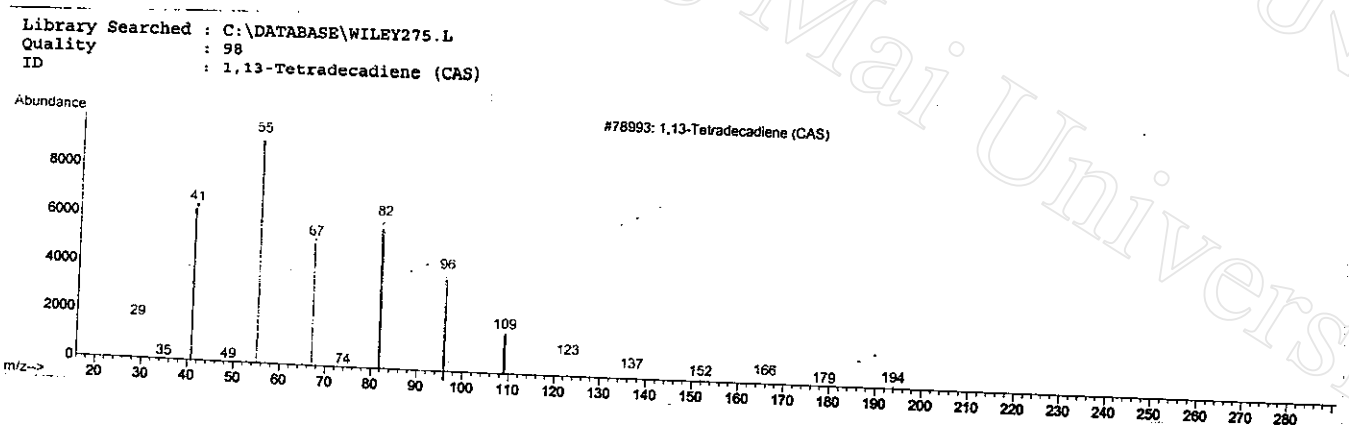


รูป2.55 แมสสเปคตรัมของ butyl phthalate ได้จาก database www.mse.gatech โดยมี %ID = 97

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

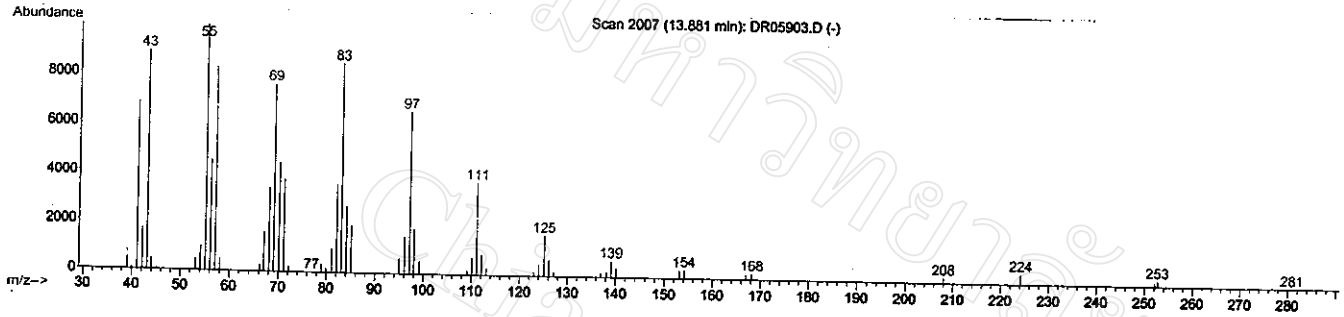


รูป 2.56 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ t_r 13.74

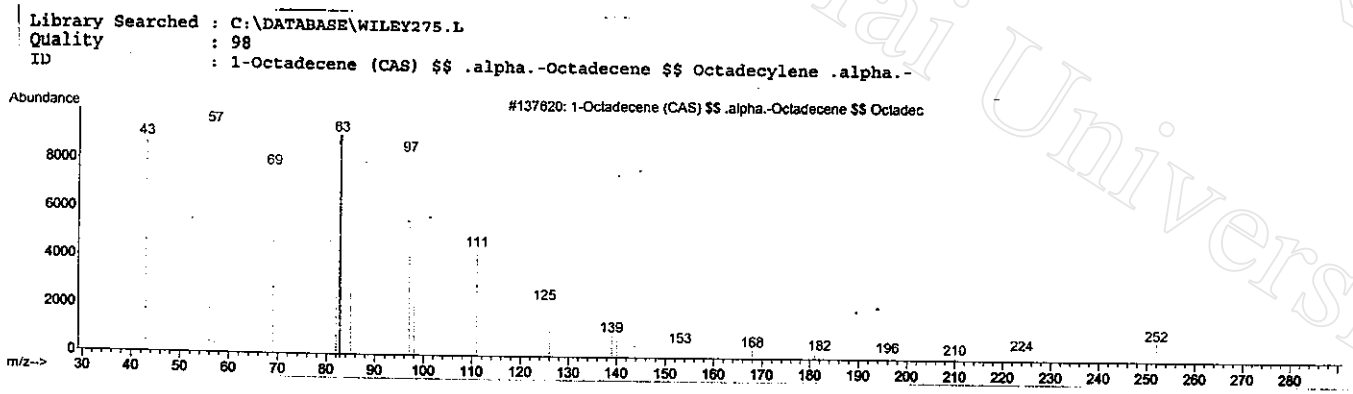


รูป2.57 แมสสเปคตรัมของ 1,13-Tetradecadiene ได้จาก database www.mse.gatech โดยมี %ID = 98

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

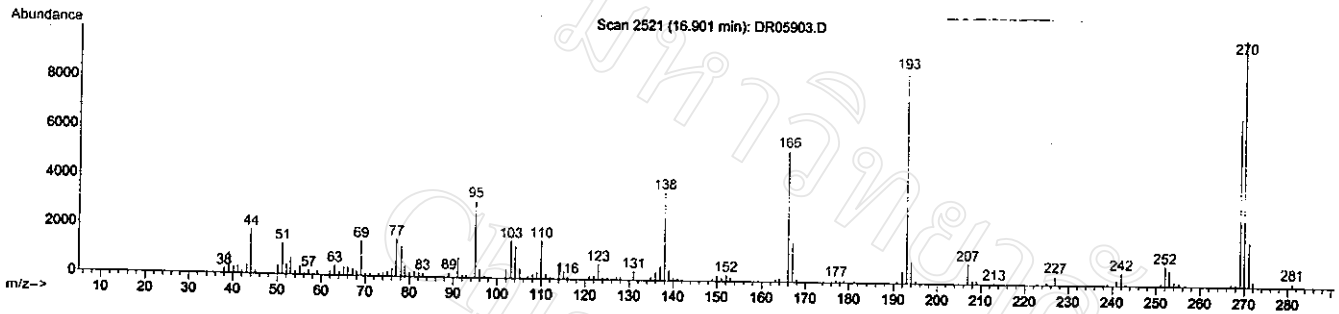


รูป 2.58 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ t_r 13.88

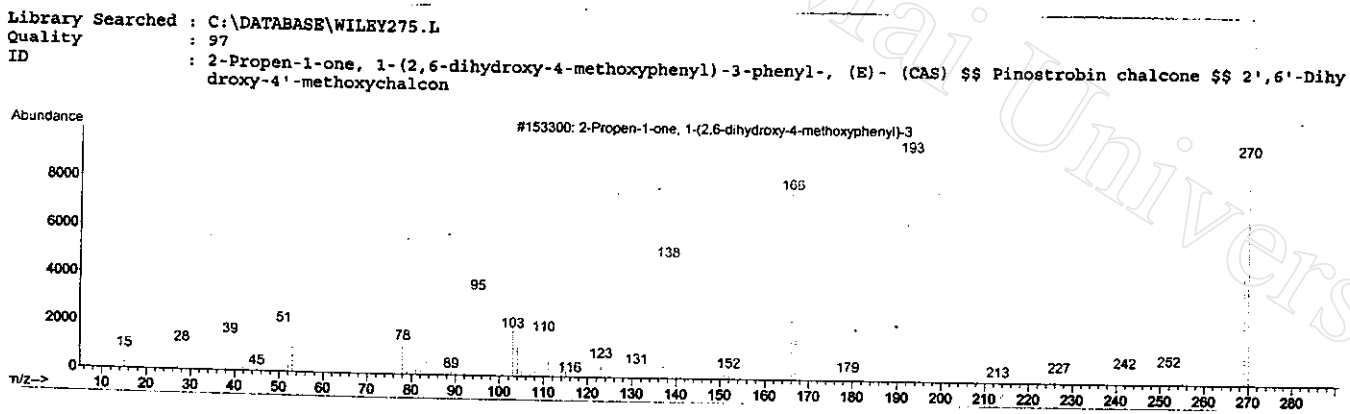


รูป2.59 แมสสเปคตรัมของ 1-Octadecene ได้จาก database www.mse.gatech โดยมี %ID = 98

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



รูป 2.60 ผลแมสสเปคตรัมของสารสกัดจากกระชายที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ t, 16.90



รูป2.61 แมสสเปคตรัมของ Pinostrobin chalcone ได้จาก database www.mse.gatech โดยมี %ID = 97

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University