

บทที่ 3

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* โดยวิธี TLC-Bioassay ของ ส่วนสกัดหยาบของฟ้าทะลายโจร กระชาย ใบและเปลือกมะนาวเป็น ใบและเปลือกมะนาวน้ำหอม โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัด คือ dichloromethane เพื่อสกัดสารไม่มีขั้วซึ่งจะสะดวกในการ วิเคราะห์โดย GC-MS พบว่าสารสกัดหยาบแต่ละชนิดมีช่วง R_f ที่ active ที่ชัดเจนดังแสดงในตาราง 2.1 หลังจากนั้นหุคเอา silica gel ในช่วงการยับยั้งเชื้อราที่ R_f ต่างๆมาแยกโดยชุดช่วงการยับยั้งเชื้อ รามาสกัดด้วย dichloromethane: methanol 50:50 หลังจากกรองเอาซิลิกาเจลออกและระเหยตัวทำ ละลายจะได้สารสกัดของช่วงยับยั้งเชื้อราของพืชแต่ละชนิด เมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี TLC- Bioassay อีกครั้งหนึ่งและสกัดสารออกมาจากช่วงที่มีการยับยั้งเชื้อรา หลังจากนั้นจึงทำการ วิเคราะห์โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี

จากการทดลองในการทำ TLC-Bioassay ครั้งแรกมองเห็น inhibit zone ชัดเจน (รูป 2.1- 2.7) แต่ในการทำซ้ำในครั้งที่ 2 เนื่องจากเปลี่ยนตัวพา ทำให้เห็น inhibit zone ไม่ชัดเจน ทำให้สาร สกัดบางตัว เช่น สารสกัดจากเปลือกผลของมะนาวเป็นและมะนาวน้ำหอมไม่สามารถหาสารต้าน เชื้อราได้

สารสกัดจากฟ้าทะลายโจรให้สารสกัดที่ยับยั้งเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ที่มีค่า t_r 3.98 จากการเปรียบเทียบกับ database mass spectrum www.msc.gatech.edu พบว่าไม่มีสารใดที่มีรูปแบบการแตกตัวในแมสสเปกตรัมที่คล้ายคลึงกันจึง ไม่สามารถทราบสูตร โครงสร้างทราบแต่เป็นสารที่มีมวล โมเลกุล 140 ส่วนที่ t_r 12.75 และ t_r 19.27 มี m/z 149 น่าจะเป็นสารพวก phthalate ซึ่งเป็น impurity ที่ปนมากับตัวทำละลายซึ่งสามารถเปรียบ เทียบกับ mass spectrum ของสาร Bis(2-ethylhexyl)phthalate (รูป 2.16)

โดยทั่วไปแล้ว สารที่เป็นองค์ประกอบหลักที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ เช่นแบคทีเรียในคนของ สารสกัดจากฟ้าทะลายโจร เป็นสารพวกแอนโดรกราโฟไลด์ (สาร 19, 20, 21)²⁰ แต่ในการทดลอง ไม่เจอสารที่เป็นองค์ประกอบหลักเหล่านี้ อาจเนื่องมาจาก สารแอนโดรกราโฟไลด์มีโมเลกุลใหญ่ และระเหยยาก การวิเคราะห์โดยเทคนิค GC-MS จึงไม่สามารถวิเคราะห์ได้ หรือสารต้านเชื้อราใน พืชอาจจะมียับยั้งหรือเป็นสารที่ต่างออกไปจากสารที่ต้านแบคทีเรียในคน

สารสกัดจากกระชายให้สารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ที่บริเวณ t_r 17.43 เป็นสารที่มีมวล โมเลกุล 331 ส่วนสารที่ t_r 21.79 และ 23.92 มี มวล โมเลกุล 432 และอาจจะเป็น isomer กันซึ่งมีลักษณะเป็น cis-trans หรือ position isomer และที่

ค่า t_r 3.28 จากการเปรียบเทียบกับ database mass spectrum www.mse.gatech.edu ที่ %ID = 91 % พบว่ามีลักษณะการแตกตัวของแมสสเปกตรัมคล้ายกับ N-vinyl-2-pyrrolidone ส่วนสารที่มี t_r 17.42 จากการเปรียบเทียบกับ database mass spectrum www.mse.gatech.edu ที่ %ID = 99 % พบว่ามีลักษณะการแตกตัวของแมสสเปกตรัมคล้ายกับ Pinostrobin chalcone

สารสกัดจากใบมะนาวแป้นให้สารสกัดยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ได้สารที่มีค่า t_r 12.41 และ t_r 14.01 เป็นสารที่มีมวลโมเลกุล 208 และ 309

สารสกัดจากใบมะนาวน้ำหอมให้สารสกัดยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ได้สารที่มีค่า t_r 12.98 และ t_r 15.69 เป็นสารที่มีมวลโมเลกุล 206 และ 355

เมื่อเปรียบเทียบสารต้านเชื้อราจากใบมะนาวแป้นและใบมะนาวน้ำหอมพบว่ามีสารที่มีมวลโมเลกุลต่างกันส่งผลให้มะนาวแป้นและมะนาวน้ำหอมมีผลต่อการต้านทานสภาวะที่ต่างกัน โดยมะนาวน้ำหอมสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่แห้งแล้งตลอดจนโรคที่เกิดกับมะนาวได้ดีกว่ามะนาวแป้นดังนั้นจึงน่าจะมีการแยกและศึกษาองค์ประกอบของสารที่ต่างกันนี้เพื่อประยุกต์ใช้ในการหาสารที่ต้านโรคที่เกิดกับมะนาวต่อไป

ในการทดลองแยกสารให้บริสุทธิ์โดยการสกัดสารจากบริเวณ R_f ที่ด้านเชื้อราหรือแบคทีเรียมาทำ TLC อีกครั้ง โดยเปลี่ยนตัวชะแล้วแยกสารออกมาก่อนนำไปทดสอบการต้านเชื้อราอาจทำให้ไม่ได้สารตัวเดียวกันกับสารใน inhibit zone ครั้งแรกหรืออาจได้สารเดิมน้อยมาก ในการทดลองจึงไม่ควรเปลี่ยนตัวชะ เพราะทำให้เห็นผลไม่ชัดเจน และเมื่อวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีไม่สามารถเห็นพิก ได้อย่างชัดเจน

ในการหาสารต้านเชื้อราจากใบและเปลือกผลของมะนาวจากการค้นคว้าพบว่า สารพวก Limmetin เป็นสารที่อยู่ในผิวมะนาวและสามารถต้านเชื้อราได้ แต่ในการทดลอง สารสกัดจากเปลือกผลมะนาวให้ผลไม่ต้านเชื้อรา และสารสกัดจากใบวิเคราะห์และแปรผลได้ไม่เหมือนกับ geraniol ซึ่งมีผู้รายงานว่าเป็นสารยับยั้งเชื้อรา อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนตัวชะในการทำ TLC-Bioassay ครั้งที่ 2

ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Serratia marcescens* โดยวิธี TLC-Bioassay ของส่วนสกัดหยาบของฟ้าทะลายโจร กระชาย ใบและเปลือกมะนาวแป้น ใบและเปลือกมะนาวน้ำหอม โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัด คือ dichloromethane พบว่ามีเพียงสารสกัดหยาบจากกระชายที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและให้สารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ $t_r = 13.745$ จากการเปรียบเทียบกับ database mass spectrum www.mse.gatech.edu ที่ %ID = 95 % พบว่ามีลักษณะการแตกตัวของแมสสเปกตรัมคล้ายกับ cis-9-Octadecen-1-ol ที่ $t_r = 13.740$ จากการเปรียบเทียบกับ database mass spectrum www.mse.gatech.edu ที่ %ID = 98 % พบว่ามีลักษณะการแตกตัวของแมสสเปกตรัมคล้าย

กับ 1,13-Tetradecadiene ที่ $t_r = 13.88$ จากการเปรียบเทียบกับ database mass spectrum www.mse.gatech.edu ที่ %ID = 98 % พบว่ามีลักษณะการแตกตัวของแมสสเปกตรัมคล้ายกับ 1-Octadecene และที่ $t_r = 16.90$ จากการเปรียบเทียบกับ database mass spectrum www.mse.gatech.edu ที่ %ID = 99 % พบว่ามีลักษณะการแตกตัวของแมสสเปกตรัมคล้ายกับ Pinostobin chachone

ในการทำ TLC-bioassay มีข้อควรระวัง คือ

1. ในการสังเกตบริเวณด้านเชื้อแบคทีเรียจะสามารถสังเกตผล ได้ชัดเจนเมื่อทำการจุดสารทดสอบบนแผ่น TLC ให้มีความเข้มข้นมากพอ (โดยประมาณ) และเชื้อแบคทีเรียไม่หนาแน่นจนเกินไป ต้องใช้เวลา 1 วัน จึงพบบริเวณด้านเชื้อแบคทีเรียชัดเจน เพราะเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตเต็มที่
2. ในการทดลองไม่มีการกำหนดปริมาณของสารสกัดหยาบที่ทำการจุดบนแผ่น TLC ทำให้ปริมาณสารที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอาจมีความเข้มข้นไม่เพียงพอต่อการยับยั้ง ดังนั้นจึงควรที่จะมีการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของสารที่แน่นอนและเพียงพอเพื่อทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแล้วให้ inhibit zone ที่ชัดเจนหรือให้ความเข้มข้นให้มากที่สุดไว้ก่อน

ในการทำให้สารบริสุทธิ์ก่อนนำไปวิเคราะห์ทางสเปกโตรสโคปีนั้น ถ้าทำใหม่มาครั้งเกินไป ทำให้สารที่ active หายไปและปริมาณสารบริสุทธิ์ที่ควรจะได้ก็น้อยลง ไม่เพียงพอในการศึกษาต่อไป