สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเอื้องหมายนาจากป่าพรุสิรินธร จังหวัดนราธิวาส

กันย์ชลา แก้วอุพัย

TH 0020512
[illegible]-8 พ.ย. 2556
328662

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
มิถุนายน 2556

เริ่มบริการ
23 มิ.ย. 2557

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ กันย์ชลา แก้วอุพัย ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จเร จรัสจรูญพงศ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยุพดี ชัยสุขสันต์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. อรอง จันทร์ประสาทสุข)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน
(ดร. โสภณัฐ คงศรีประพันธุ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จเร จรัสจรูญพงศ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยุพดี ชัยสุขสันต์)

.....กรรมการ
(ดร. อรอง จันทร์ประสาทสุข)

.....กรรมการ
(ดร. ประภาพรรณ เตชะเสาวภาคย์)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุษาวดี ดันติวรานุรักษ์)
วันที่ 28 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2556

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์/ดุษฎีนิพนธ์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปีงบประมาณ 2556

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร.จเร จรัสจรูญพงศ์, ผศ.ดร. ยุพดี ชัยสุขสันต์และ ดร. อรอง จันทร์ประสาทสุข อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ช่วยเหลือในทุกปัญหาการวิจัยพร้อมทั้งให้กำลังใจ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนทุนในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาทุกท่าน ที่ช่วยสอนวิชาเคมีในส่วนของเนื้อหา และปฏิบัติการเคมีอย่างเข้มข้น เพื่อปลูกฝังให้ข้าพเจ้าเป็นนักวิทยาศาสตร์ และเป็นครูวิทยาศาสตร์ที่มีความรู้ในภาคทฤษฎี และภาคปฏิบัติวิชาเคมีเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่าน ที่ช่วยปลูกฝังในเรื่องของความรู้วิชาเคมี และคุณลักษณะของการเป็นนักวิทยาศาสตร์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำคณะศึกษาศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่าน ที่ช่วยปลูกฝังในเรื่องของความรู้เกี่ยวกับทักษะการสอนนักเรียน และคุณลักษณะของการเป็นครูที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ ดร.วรนาฎ จงโยธา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อทอง แก้วอุพัย คุณแม่พิม แก้วอุพัยและสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนข้าพเจ้าเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนคราบเท่าทุกวันนี้

กันย์ชลา แก้วอุพัย

53990112: สาขาวิชา: เคมีศึกษา; วท.ม. (เคมีศึกษา)
คำสำคัญ: ป่าพรุสิรินธร/ เอื้องหมายนา/ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ/ สารประกอบฟีนอลรวม/ การวิเคราะห์ด้วย GC-MS

กันย์ชลา แก้วอุพัย: ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเอื้องหมายนาจากป่าพรุสิรินธรจังหวัดนราธิวาส (ANTIOXIDANT ACTIVITIES, TOTAL PHENOLIC AND CHEMICAL CONSTITUENTS OF THE *COSTUS SPECIOSUS* SMITH. CRUDE EXTRACT FROM SIRIDHORN PEAT SWAMP FOREST, NARATHIWAT). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จเร จรัสจรูญพงศ์, Ph.D., ยุพดี ชัยสุขสันต์, Ph.D., อรอง จันทร์ประสาทสุข, Ph.D. 95 หน้า. ปี พ.ศ. 2556.

ป่าพรุสิรินธร (Sirindhorn Peat Swamp Forest, Narathiwat) เป็นป่าพรุที่มีความอุดมสมบูรณ์ มีการกระจายพันธุ์ของพืชหลากหลายชนิด เอื้องหมายนา (*Costus speciosus Smith)* เป็นพืชตระกูล Costaceae ที่พบได้ในป่าพรุสิรินธร สรรพคุณคือ เหง้าสดใช้ประกอบอาหาร เหง้าแห้งใช้ต้มน้ำกิน เป็นยาขับปัสสาวะ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบจากส่วน เหง้า ลำต้น และใบของต้นเอื้องหมายนา ในตัวทำละลายเฮกเซน (Hexane) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromehane) และเมทานอล (Methanol) โดยนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทำการทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน คือ วิตามินซี (กรดแอสคอร์บิก) และบีเอชที (BHT) ทดสอบความสามารถในการรีดิวส์ (Reduce) เหล็ก ด้วยวิธี FARP หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี GC-MS

จากการวิจัยพบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลของเหง้าเอื้องหมายนามีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ส่วนความสามารถในการรีดิวส์ (Reduce) เหล็กด้วยวิธี FARP สารสกัดหยาบทั้งหมดมีความสามารถในการรีดิวส์เหล็ก โดยสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนของต้นเอื้องหมายนามีความสามารถในการรีดิวส์สูงที่สุด เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม พบว่าในสารสกัดหยาบเมทานอลของเหง้าเอื้องหมายนามีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงสุดและเมื่อทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี GC-MS พบว่ามีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 6 ชนิด คือ 4-methyl-2,6-di-tert-butylphenol, methyl laurate, methyl palmitoleinate, palmitic acid, methyl linoleate and methyl-9,I2,15-octadecatrienoate นอกจากนี้ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบ ไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* และยีสต์ *Candida albicans*

53990120: MAJOR: CHEMICAL EDUCATION; M.Sc. (CHEMICAL EDUCATION)
KEYWORDS: SIRINDHORN PEAT SWAMP FOREST/ *COSTUS SPECIOSUS* SMITH./ ANTIOXIDANT ACTIVITY/ TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS/ GC-MS ANALYSIS

KANYCHALA KAEOUPHAI: ANTIOXIDANT ACTIVITIES, TOTAL PHENOLIC AND CHEMICAL CONSTITUENTS OF THE *COSTUS SPECIOSUS* SMITH. CRUDE EXTRACT FROM SIRIDHORN PEAT SWAMP FOREST, NARATHIWAT. ADVISORY COMMITTEE: JARAY JARATJAROONPHONG, Ph.D.,YUPADEE CHAISUKSUN Ph.D., ON-ONG CHANPRASARTSUK, Ph.D. 95 P. 2013.

Sirindhorn peat swamp forest in Narathiwat has biological diversity resources. The *Costus speciosus* Smith plant is one of the family Costaceae found in the peat swamp forest. Fresh rhizome of this plant is used in certain food preparations. Dried rhizome is used as a diuretic and also as herbal medicine for leucorrhea, urinary tract infection and inflammation. In this study, the antioxidant activities of hexane, dichloromethane and methanol subfractions of rhizomes, leaves and stems of *Costus speciosus* Smith were evaluated for various assays, including DPPH radical scavenging and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. total phenolic compounds and GC-MS analysis

Among solvent extracts, the methanol subfraction of the rhizome showed the highest DPPH radical scavenging activity while the dichloromethane fraction of the stem showed high reducing power activity. In addition, total phenolic compounds were evaluated in these extracts using the Folin–Ciocalteu method. The methanol subfraction of the rhizomes contained highest phenolics content among others. The GC-MS analysis of the methanol extracts of *Costus speciosus* Smith rhizomes was also carried out and it showed the presence of phytochemicals that exhibited antioxidant activitied such as 4-methyl-2,6-di-tert-butylphenol, methyl laurate, methyl palmitoleinate, palmitic acid, methyl linoleate and methyl-9,12,15-octadecatrienoate. And the crude extracts were also assayed their activities by the Agar disc diffusion method they unfortunately, were inactive against gram-positive bacteria; *Staphylococcus aureus* as well as gram-negative bacteria; *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and the yeast *Candida albicans*.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฌ

บทที่

1. บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 สมมติฐานของการวิจัย 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 3

1.5 ขอบเขตของการวิจัย 3

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ 4

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 ข้อมูลพืชตัวอย่าง 5

2.2 การสกัดสารสำคัญจากพืชตัวอย่าง 6

2.3 อนุมูลอิสระ 8

2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ 16

2.5 เทคนิคแอบซอบชันสเปกโตรสโกปี 22

2.6 แก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมทรี 25

2.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชตัวอย่าง 25

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 30

3. วิธีดำเนินการวิจัย 35

3.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี 35

3.2 วิธีการวิจัย 36

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4. ผลการวิจัยและอภิปรายผล	41
4.1 ปริมาณของสารสกัดหยาบจากส่วนเหง้า ใบและต้นเอื้องหมายนา	41
4.2 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ	42
4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม	51
4.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเหง้าเอื้องหมายนา ในตัวทำละลายเมทานอลด้วยเทคนิค GC/MS	52
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเอื้องหมายนา	60
5. สรุปผลการทดลอง	66
5.1 ข้อเสนอแนะ	67
บรรณานุกรม	68
ภาคผนวก	73
ภาคผนวก ก	74
ภาคผนวก ข	78
ภาคผนวก ค	80
ภาคผนวก ง	88
ประวัติย่อของผู้วิจัย	95

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2-1 แสดงความมีขั้วของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ..... 8

2-2 ตัวอย่างอนุมูลอิสระ..... 10

4-1 Yield ของสารสกัดหยาบในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล จากส่วนเหง้า ใบ และต้นเอื้องหมายนา..... 41

4-2 ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอลจากส่วนเหง้าเอื้องหมายนา..... 43

4-3 ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอลจากส่วนใบเอื้องหมายนา..... 43

4-4 ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอลจากส่วนต้นเอื้องหมายนา..... 44

4-5 ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของ ascorbic acid และ BHT ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 44

4-6 ค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบในตัวทำละลายเฮกเซนไดคลอโรมีเทนและเมทานอล จากส่วนเหง้า ใบและต้นเอื้องหมายนา..... 45

4-7 ความสามารถในการรีดิวส์ Fe^{3+} ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหง้า ใบและ ต้นเอื้องหมายนา ที่มีความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร..... 48

4-8 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH assay และ FRAP assay..... 50

4-9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบจากส่วนเหง้า ใบ และต้นเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล..... 49

4-10 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมทานอลจากเหง้าเอื้องหมายนา จากการวิเคราห์ด้วยเทคนิค GC/MS..... 57

4-11 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกของสาร สกัดหยาบเอื้องหมายนา..... 61

4-11 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบของสาร สกัดหยาบเอื้องหมายนา..... 21

4-10 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้งยีสต์ของสารสกัดหยาบเอื้องหมายนา..... 63

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	เอื้องหมายนา *(Costus speciosus* (J.G. Koenig) Sm.)	5
2-2	การทำงานของเอ็นไซม์ Lipoxygenase ในปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน.....	12
2-3	โครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์.....	18
2-4	Ascorbic acid.....	19
2-5	α- tocophero (วิตามินอี).....	19
2-6	ตัวอย่างของกลุ่มฟลาโวนอยด์.....	20
2-7	กลไกการจับโลหะของสารประกอบฟลาโวนอยด์.....	21
2-8	การทำงานของวิตามินอี ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในไขมัน.....	22
2-9	หลักการวิเคราะห์สารด้วยเทคนิคแอบซอบชันสเปกโตสโกปี.....	23
2-10	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นที่ของสารละลายมาตรฐานและการใช้ประโยชน์เพื่อหาค่าเข้มข้นของสารตัวอย่าง.....	24
3-1	แผนผังแสดงขั้นตอนการสกัดส่วนสกัดจากตัวอย่างเอื้องหมายนา.....	37
4-1	กราฟแสดงร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบจากเหง้าเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	43
4-2	กราฟแสดงร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบจากใบเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	44
4-3	กราฟแสดงร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบจากส่วนต้นเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	45
4-4	กราฟแสดงร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของ Ascorbic acid และ BHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	46
4-5	ตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารสกัดเมทานอลจากเหง้าเอื้องหมายนาจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/MS.....	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4-6	ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารสกัดเมทานอลจากเหง้าเอื้องหมายนา ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched : wiley7N edition, Retention Time 5.17 minute, Quality : 86 %, Total : 8.45 %, ID : 2,3-butanediol.....	54
4-7	โครมาโตแกรมของสารสกัดเอื้องหมายนา ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched : wiley7N edition, Retention Time 9.29 minute, Quality : 90 %, Total : 2.05 %, ID : 2-ethylhexanol.....	55
4-8	โครมาโตแกรมของสารสกัดเอื้องหมายนา ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched : wiley7N edition, Retention Time 12.22 minute, Quality : 83 %, Total : 3.21 %, ID : 3-cyclohexane-1-methanol.....	56
ก-1	ต้นเอื้องหมายนา.....	75
ก-2	เหง้าเอื้องหมายนา.....	75
ก-3	ใบเอื้องหมายนา.....	76
ก-4	ลำต้นเอื้องหมายนา.....	76
ก-5	เหง้าเอื้องหมายนาแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน.....	77
ก-6	ใบเอื้องหมายนาแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน.....	77
ก-7	ต้นเอื้องหมายนาแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน.....	77
ก-8	ตัวอย่างสารสกัดหยาบเหง้าเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเฮกเซน.....	77
ก-9	ตัวอย่างสารสกัดหยาบเหง้าเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเฮกเซน.....	77
ก-10	ตัวอย่างสารสกัดหยาบเหง้าเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเฮกเซน.....	77
ค-11	กราฟสมการในการคำนวนค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน Ascorbic.....	81
ค-12	กราฟสมการในการคำนวนค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน BHT.....	82
ค-13	กราฟสมการในการคำนวนค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากเหง้าเอื้องหมายนา.....	83
ค-14	กราฟสมการในการคำนวนค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากใบเอื้องหมายนา.....	84
ค-15	กราฟสมการในการคำนวนค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากต้นเอื้องหมายนา.....	86

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

ง-16 โครมาโทแกรมของสารสกัดเอื้องหมายนา ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched : wiley 7 N edition, Retention Time 16.37 minute, Quality : 98 %, Total : 0.61 %, ID : 4-methyl-2,6-di-tert-butylphenol..... 89

ง-17 โครมาโทแกรมของสารสกัดเอื้องหมายนา ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched : wiley 7 N edition, Retention Time 16.57 minute, Quality : 95 %, Total : 0.13 %, ID : methyl laurate..... 90

ง-18 โครมาโทแกรมของสารสกัดเอื้องหมายนา ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched : wiley 7 N edition, Retention Time 20.97 minute, Quality : 53 %, Total : 0.13 %, ID : methyl palmitoleinate..... 91

ง-19 โครมาโทแกรมของสารสกัดเอื้องหมายนา ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched : wiley 7 N edition, Retention Time 21.18 minute, Quality : 99 %, Total : 1.66 %, ID : palmitic acid..... 92

ง-20 โครมาโทแกรมของสารสกัดเอื้องหมายนา ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched : wiley 7 N edition, Retention Time 22.88 minute, Quality : 99 %, Total : 1.17 %, ID : methyl linoleate..... 93

ง-21 โครมาโตแกรมของสารสกัดเอื้องหมายนา ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched : wiley 7 N edition, Retention Time 22.94 minute, Quality : 83 %, Total : 0.10 %, ID : methyl 9,12,15, octadecatrienoate..... 94

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันการดำเนินชีวิตและกิจกรรมต่าง ๆ เป็นไปอย่างเร่งรีบ ทำให้ชีวิตมนุษย์ตกอยู่ในสภาวะที่ขาดความสมดุล สิ่งแวดล้อมถูกทำลายและเต็มไปด้วยมลพิษในหลากหลายรูปแบบ ทำให้คนส่วนใหญ่ต้องเผชิญกับความเครียดที่เกี่ยวข้องกับออกซิเจน (Oxidative stres) โดยเป็นภาวะที่เกิดจากความไม่สมดุลระหว่างการเกิดและการป้องกันอนุมูลอิสระ ทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในเซลล์มากเกินไป อนุมูลอิสระต่างๆ เกิดขึ้นได้จากขั้นตอนการเผาผลาญ กระบวนการหายใจของเซลล์ รวมทั้งมลภาวะต่าง ๆ รอบตัว เช่น ควันบุหรี่ ก๊าซพิษจากท่อไอเสีย ซึ่งล้วนส่งผลเสียทั้งทางตรงและทางอ้อมแก่การดำรงชีวิตของคนและสัตว์ โดยระบบการทำงานต่าง ๆ ของร่างกายมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับสุขภาพ เช่น ภาวะทุพพลภาพและการเกิดโรคภัยต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน โรคแก่ก่อนวัย โรคพาร์กินสัน โรคอัลไซเมอร์ และโรคหัวใจที่มีสาเหตุจากการอุดตันของเส้นเลือด โดยอาจเกิดขึ้นอย่างฉับพลันและบางครั้งโรคอาจเกิดจากการสะสมของสารมลพิษต่าง ๆ ที่บริเวณหลอดเลือดทำให้ผนังหลอดเลือดถูกทำลาย (Shetty, 1997) นอกจากนี้ยังมีโรคร้ายอื่น ๆ อีกมากมายทั้งที่เป็นโรคกลับซ้ำและเป็นโรคที่เกิดขึ้นใหม่โดยอาจจะเกิดจากสิ่งมีชีวิต เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย โปรโตซัว และอาจจะเกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต เช่น สารหรือก๊าซพิษ เป็นต้น

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) เป็นสารที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระและช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้มีผลทำลายเซลล์ ในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ได้พิสูจน์ว่า สามารถป้องกันการเกิดภาวะต่าง ๆ ดังกล่าวได้ โดยมีบทบาทสำคัญในการชะลอความชรา และการลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง และโรคหัวใจ (Hakimuddin et al., 2004) ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากได้ศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการตรวจสอบและการสกัดแยกสารองค์ประกอบจากพืชสมุนไพรต่าง ๆ เพื่อหาแนวทางในการลดและป้องกันการเกิดโรคภัยต่าง ๆ ดังกล่าวอย่างจริงจัง (รัดนา อินทรานุปกรณ์, 2547)

ป่าพรุสิรินธร ตั้งอยู่ในจังหวัดนราธิวาส เป็นป่าพรุที่มีความสมบูรณ์ที่สุดในประเทศไทย มีความหลากหลายของทรัพยากรทางชีวภาพ (biological diversity resources) มีความอุดมสมบูรณ์ทั้งพันธุ์พืชและสัตว์ (จำลอง เพ็งคล้าย, 2534) ประชากรในพื้นที่มีการใช้สมุนไพรและพืช

ในท้องถิ่นในการรักษาโรคมาหลายชั่วอายุคน โดยเฉพาะพืชที่อยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) เช่น ขิง ข่า ขมิ้น ไพร ซึ่งในปัจจุบันพืชเหล่านี้ได้ถูกนำมาวิจัยเพื่อใช้ประโยชน์ทั้งในด้านที่เป็นยารักษาโรค อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมการอาหาร เนื่องจากพฤกษเคมีของพืชเหล่านี้ช่วยลดความดัน (Miquel et al., 2002) ช่วยลดการอักเสบ รักษาแผล (Habsah et al., 2000) และแก้อาการปวด (Sirat et al., 1996) เป็นต้น

เอื้องหมายนา (*Costus speciosus* Smith) เป็นพืชวงศ์ Costaceae อันดับ Zingiberales มีถิ่นกำเนิดที่ประเทศอินเดีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ถึงนิวกินีและพบในป่าพรุสิรินธร (http://www.phargarden.com/main.php) ลักษณะเป็นไม้เนื้ออ่อน มีเหง้าใต้ดิน ออกเป็นกอแน่นสูง 1 – 3 เมตร สรรพคุณคือ เหง้าสด ใช้ประกอบอาหาร เหง้าแห้งใช้ต้มน้ำกินเพื่อขับปัสสาวะ แก้บวมน้ำ แก้ตกขาว แก้โรค ติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ แก้แผลหนอง อักเสบ บวม ฆ่าพยาธิ รากใช้ขับพยาธิ ขับเสมหะ แก้ไอ แก้โรคผิวหนัง ต้นสมานมดลูก รักษาอาการปวดมวนในท้อง โรคกระเพาะอาหาร ท้องผูก ถ่ายเป็นเลือด นอกจากนี้ยังมีรายงานผลการวิจัยว่า สารสกัดของสมุนไพรชนิดนี้สามารถรักษาโรคผิวหนัง งูกัด เหง้า ช่วยรักษาโรคปอดบวม ท้องมาน และลดไข้ (Srivastava et al., 2011) จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยเล็งเห็นความสำคัญและความจำเป็นที่จะศึกษาพืชสมุนไพรเอื้องหมายนา เกี่ยวกับสมบัติด้านฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม และองค์ประกอบทางเคมีของเอื้องหมายนา เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตสารองค์ประกอบสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับอุตสาหกรรมต่อไป โดยการสกัดตัวอย่างต้นเอื้องหมายนาส่วนเหง้า ใบ และลำต้น ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ นำส่วนสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging assay) ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay และทดสอบการรีดิวส์เหล็กด้วยวิธี Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมทรี (GC/MS)

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสกัดสารจาก เหง้า ใบ และต้นเอื้องหมายนา ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล

2. เพื่อศึกษาฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการรีดิวส์เหล็ก ของสารสกัดหยาบ จากส่วนเหง้า ใบและต้นเอื้องหมายนา ในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล

3. เพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบ จากส่วนเหง้า ใบและต้นเอื้องหมายนา ในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method

4. เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ จากส่วนเหง้าเอื้องหมายนา ในตัวทำละลายเมทานอล ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมทรี (GC/MS)

1.3 สมมุติฐานการวิจัย

1. สารสกัดหยาบที่ได้จากส่วนเหง้า ใบ และต้นเอื้องหมายนา มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมที่แตกต่างกัน

2. สารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายต่างชนิดกัน มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมที่แตกต่างกัน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าน่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการรีดิวส์ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหง้า ใบ และต้นของเอื้องหมายนา ในดัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล

2. ทราบถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบจาก เหง้า ใบและต้นเอื้องหมายนา ในดัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล

3. ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมีที่มีในสารสกัดหยาบจากเหง้าเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเมทานอล

4. เป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เป็นประโยชน์สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตยาสมุนไพร ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและอาหารเสริมสุขภาพ จากส่วนสกัดเหง้า ใบและต้นของเอื้องหมายนา

1.5 ขอบเขตงานวิจัย

1. สารสกัดหยาบได้จากนำต้นเอื้องหมายนาสด เก็บจากบริเวณศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร จังหวัดนราธิวาส นำมาแยกเป็นส่วน เหง้า ใบ และต้น หั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปตากให้แห้ง บดให้ละเอียด ห่อด้วยผ้าขาวบาง แยกใส่ลงในขวดโหล 3 ขวด แต่ละขวดเติมตัวทำละลายเฮกเซนพอท่วม ปิดฝาทิ้งไว้และนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง ทำให้แห้งด้วยวิธีการ

rotary evaporator แล้วนำกากที่เหลือผึ่งให้แห้ง สกัดด้วยวิธีเดียวกันแต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็นไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ตามลำดับ

2. ทำการทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay และความสามารถในการรีดิวส์อนุมูลเหล็กด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัดหยาบจาก เหง้า ใบและต้นเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล

3. วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในสารสกัดหยาบจาก เหง้า ใบและต้นเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method

4. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมทรี (GC/MS) ของสารสกัดหยาบจากเหง้าเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเมทานอล

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ

1. Crude Extract คือสารสกัดหยาบ ในงานวิจัยนี้คือ สารสกัดหยาบของเหง้า ใบและต้นเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล

2. DPPH assay คือการทดสอบหาปริมาณการต้านอนุมูล DPPH

3. FRAP assay คือการหาความสามารถในการรีดิวส์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+}

4. ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม คือปริมาณสารประกอบฟีนอลที่มีในสารสกัดหยาบ

5. GC/MS คือเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมทรี

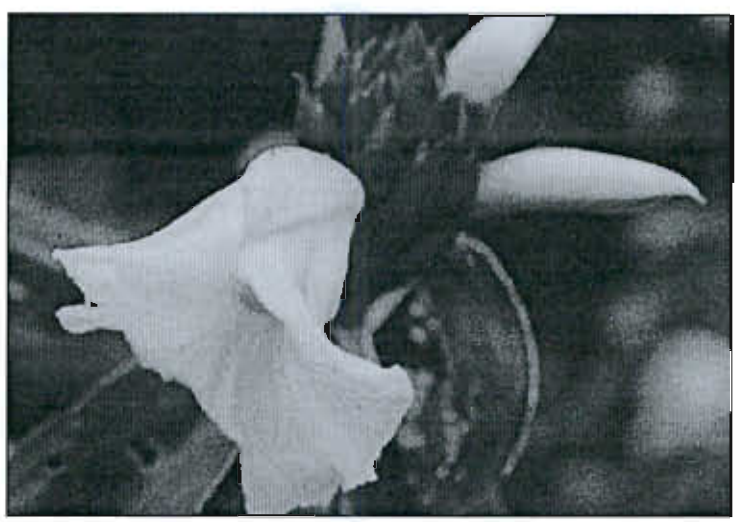
6. ฤทธิ์ทางชีวภาพคือ ฤทธิ์ในการยับยั้ง แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus,* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* และยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans*

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลพืชตัวอย่าง เอื้องหมายนา (*Costus speciosus* (J.G. Koenig) Sm.)

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของเอื้องหมายนา

พืชในสกุลเอื้องหมายนา (Spiral Flag) อยู่ในอยู่ในวงศ์ Costaceae อันดับ Zingiberales มีชื่อพ้องได้แก่ Wild Ginger, Crepe Ginger, Malay Ginger และ Spiral Flag เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบเขตร้อน พบในประเทศอินเดีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ถึงนิวกินี มีประมาณ 90 ชนิด เจริญได้ดีทั้งในที่มีร่มเงาบ้างหรือกลางแสงแดดจัด และมีความชื้นสูง ขยายพันธุ์โดยการแบ่งกอหรือการเพาะเมล็ด (www.eto.ku.ac.th/neweto/e-book/plant/flower/wildginger.pdf)



ภาพที่ 2-1 เอื้องหมายนา *(Costus speciosus* (J.G. Koenig) Sm.)

(http://www.eto.ku.ac.th/neweto/e-book/plant/flower/ wildginger.pdf)

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เอื้องหมายนาเป็นไม้เนื้ออ่อนมีเหง้าใต้ดิน ลำต้นเหนือดินแตกเป็นกอแน่นสูง 1-3 เมตร ใบเดี่ยวเรียงเวียนสลับ กาบใบปิดโอบรอบลำต้นสีแดงหรือน้ำตาลแดง มีประสีเขียว ใบกว้าง 3-10 เซนติเมตร ยาว 12-25 เซนติเมตร ใบรูปรี รูปใบหอก ปลายใบแหลม โคนใบมน ด้านท้องใบมีขนนุ่มสีเงินเป็นมันคล้ายเส้นไหม ดอกจะออกที่ปลายลำต้นเหนือดิน หรือแทงออกจากดินโดยตรง

บนลำต้นเหนือดินไม่มีใบ ช่อดอกมีลักษณะรูปไข่ยาว 8-12 เซนติเมตร (ภาพที่ 2-1) ประกอบด้วย กาบรองดอกที่เรียงเวียนสลับซ้อนทับกัน กาบรองดอกรูปไข่ ปลายแหลมปลายแข็งคล้ายหนาม สีเขียวปนแดงยาว 1.5-4.5 เซนติเมตร แต่ละกาบรองรับดอกย่อย 1 ดอก ดอกทยอยบานครั้งละ 1-2 ดอก กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกันเป็นหลอดและเป็นสัน 3 พู ปลายแยกเป็น 3 กลีบแยกเป็น 2 ปาก ปากด้านล่าง 1 กลีบ กลีบแยกลึก ปากด้านบนมี 2 กลีบ ดอก 3 กลีบกว้าง 1.5-2 เซนติเมตร ยาว 4-5 เซนติเมตรโคนกลีบเชื่อมติดกันเล็กน้อยสีขาว เกสรตัวผู้ที่ไม่สมบูรณ์เปลี่ยนไป มีลักษณะคล้ายกลีบดอกมีขนาดใหญ่กว่ากลีบดอก กว้างประมาณ 10 เซนติเมตร ยาวประมาณ 5 เซนติเมตร รูปไข่ กลีบสีขาวขอบม้วนซ้อนทับกันตรงกลาง กลีบด้านในเป็นสีเหลือง มีขนสีเหลืองปกคลุมเป็นสันตื้นๆ 3 สันไปยังปลายกลีบ เกสรตัวผู้ที่สมบูรณ์ 1 อัน ก้านเกสรตัวผู้ แผ่แบนเป็นแถบกว้างประมาณ 1.2 เซนติเมตร ยาว 4-4.5 เซนติเมตร โดยส่วนปลายกว้างประมาณ 6-7 มิลลิเมตร มีสีเหลืองเข้มและม้วนลงด้านล่าง อับละอองเกสรตัวผู้ติดอยู่ใต้บริเวณ สีเหลืองกว้าง 3.5 มิลลิเมตรยาว 1 เซนติเมตร เกสรตัวเมีย 1 อัน ก้านเกสรเป็นอิสระ ส่วนปลายแทรกอยู่ระหว่างถุงละอองเกสรตัวผู้ ยอดเกสรตัวเมียแผ่ออกอยู่เหนืออับละอองเกสรตัวผู้ ผลเป็นแคปซูลรูปไข่ยาว 1-2.5 เซนติเมตร ส่วนรังไข่ มี 3 ช่อง มีออวูลจำนวนมาก เมล็ดเป็นเหลี่ยมมีแอริล (www.eto. ku.ac.th/neweto/e-book/plant/flower/wildginger.pdf)

2.1.3 ประโยชน์

ต้นที่มีดอกนิยมตัดประดับแจกัน เนื่องจากทั้งต้นและกาบประดับสวยงามแปลกตา น้ำคั้นใช้เป็นยาระบาย รับประทานกับพลูแก้ไอ ใบแก้ไข้ เหง้ามีสารชื่อ diosgenin เหง้าสดใช้ประกอบอาหาร เหง้าแห้งใช้ต้มน้ำกินเพื่อขับปัสสาวะ แก้บวมน้ำ แก้ตกขาว แก้โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ แก้แผลหนอง อักเสบ เป็นแผล บวม ฆ่าพยาธิ รากใช้ขับพยาธิ ขับเสมหะ แก้ไอ แก้โรคผิวหนัง ต้นสมานมดลูก รักษาอาการปวดมวนในท้อง โรคกระเพาะอาหาร ท้องผูกและอาการถ่ายเป็นเลือด (Srivastava et al., 2011)

2.2 การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรสามารถทำได้หลายวิธี สำหรับการสกัดเบื้องต้นจะได้องค์ประกอบเป็นของผสมหรือสารสกัดหยาบ ซึ่งสารสกัดหยาบเป็นสิ่งที่ได้จากการสกัดสมุนไพรโดยใช้ตัวทำละลาย สารสกัดหยาบนี้เป็นของผสมขององค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพร ซึ่งมีทั้งองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาซึ่งเรียกว่า สารสำคัญ และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งเรียกว่า สารเฉื่อย โดยชนิดและสัดส่วนขององค์ประกอบในสารสกัดจะเปลี่ยนไป

ตามสภาพของสมุนไพรที่ใช้และสภาวะที่ใช้ในการสกัด สำหรับการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดมาเซอเรชัน ดังรายละเอียดในหัวข้อ 2.2.1

2.2.1 วิธีการสกัดมาเซอเรชัน (Maceration)

มาเซอเรชัน เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยการหมักสมุนไพรด้วยตัวทำละลาย ในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท จนกระทั่งเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่ม และตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมาได้ ในการสกัดจะใช้เวลาประมาณ 7 วันหรือจนกระทั่งองค์ประกอบที่ต้องการละลายออกมาหมด ระหว่างทำการหมัก ควรเขย่าหรือคนเป็นครั้งคราวเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรองแยกกากออกจากตัวทำละลาย การสกัดแบบนี้เหมาะสมกับพืชสมุนไพรที่มีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อที่ไม่แข็งแรงมากนัก เช่น ใบ และ ดอก ซึ่งทำให้อ่อนนุ่มได้ง่าย จัดเป็นวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายปริมาณน้อย จึงเป็นวิธีการที่ประหยัดสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อยและใช้เวลาไม่มาก (นันทวัน บุญยะประภัศร, 2534)

2.2.2 การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม

ในการสกัดสารสำคัญจากพืชนั้น จะต้องเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการจะแยก โดยมีหลักในการเลือกตัวทำละลาย ดังต่อไปนี้

1. สมบัติของสารที่ต้องการสกัด เช่น ความมีขั้วของสาร และความคงตัวของสารในตัวทำละลายนั้น ในอุณหภูมิสูง ความมีขั้วของตัวทำละลายต่างๆ ที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญจากพืชแสดงดังตารางที่ 2-1 (http://chemsci.kku.ac.th/crystal/cryst05.html)
2. มีความสามารถในการละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี
3. ไม่ละลายปนเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายของสารผสมที่ถูกสกัดนั้น
4. ไม่ควรละลายสิ่งเจือปนหรือสารที่ไม่ต้องการ
5. สามารถแยกออกจากตัวถูกละลายได้ง่ายภายหลังที่สกัดแล้ว
6. ไม่ควรทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด
7. ตัวทำละลายควรมีราคาไม่แพงมาก

ตารางที่ 2-1 ความมีขั้วของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ความมีขั้ว	ตัวทำละลาย
ไม่มีขั้ว	ปิโตรเลียมอีเทอร์
↓	เฮกเซน
	คาร์บอนเตตระคลอไรด์
	เบนซีน
	ไดคลอโรมีเทน
	คลอโรฟอร์ม
	ไดเอทิลอีเทอร์
	เอทิลแอซิเตต
	อะซิโตน
	1- โพรพานอล
มีขั้ว	เอทานอล
	เมทานอล
	น้ำ

2.3 อนุมูลอิสระ (Free radicals)

2.3.1 ความหมายและชนิดของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ หมายถึง สารหรือโมเลกุลที่ไม่เสถียร เพราะมีอิเล็กตรอนที่ขาดคู่อยู่ในวงรอบของอะตอม (โอภา วัชรคุปต์ และคณะ, 2550) เนื่องจากขาดอิเล็กตรอน ต้องหาอิเล็กตรอนเพื่อมาทำให้เกิดความเสถียร ดังนั้นจึงไปแย่งอิเล็กตรอนจากสารอื่นมาทดแทน สารอื่นที่ถูกแย่งอิเล็กตรอนมาก็กลายเป็นสารที่สร้างปัญหา เพราะจะต้องไปแย่งอิเล็กตรอนมาทดแทนเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ขึ้นต่อเนื่อง โดยที่อนุมูลอิสระมีสมบัติเหมือนกับสารชนิดด่าง ๆ นั่นคือ มีความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่น สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง (pH) และความชื้น เป็นต้น อนุมูลอิสระถ้าเกิดในระบบของสิ่งมีชีวิตอาจทำให้เกิดอันตรายกับส่วนประกอบที่สำคัญของเซลล์บริเวณรอบ ๆ นั้น ไม่ว่าจะเป็นโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรด หรือดีเอ็นเอ และเสียหน้าที่การทำงาน ดังนั้นในสภาวะที่มีการสร้างสารอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมากจะก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ได้ เช่น

โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคพาร์กินสัน (Parkinson) (Banerjee et al., 2004) มะเร็ง โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer) ไขข้ออักเสบ และต้อกระจก เป็นต้น

นอกเหนือจากอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ยังมีตัวกระตุ้นที่สำคัญเรียกว่า Reactive Oxygen Species (ROS) ซึ่งหมายถึงโมเลกุลที่ว่องไวต่อการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ที่อยู่รอบข้าง ในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น มีผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นการทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ (Hsieh et al., 2004) การเปลี่ยนแปลงสภาพโปรตีน ตลอดจนไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์หรือการสร้างพันธะโควาเลนต์ (Covalent bond) กับโปรตีนหรือกับเอ็นไซม์บางชนิดจนทำให้การทำงานของโปรตีนหรือเอนไซม์ชนิดนั้น ๆ ผิดปกติไป ทำลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ เช่น กรดนิวคลีอิกหรือคาร์โบไฮเดรต (Prakash et al., 2006) เป็นต้น อนุมูลอิสระนี้มีทั้งที่อยู่ในสภาวะที่เป็นกลางทางไฟฟ้าและอนุมูลในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้าโดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ เช่น อนุมูล pyridinyl ($NAD^{+\cdot}$) อนุมูล superoxide ($O_2^{-\cdot}$) หรือเป็นกลาง เช่น อนุมูล peroxyl ($ROO^{\cdot}$) หรือ อนุมูล thiyl ($RS^{\cdot}$) เป็นต้น ซึ่งจากคำจำกัดความนี้ ส่งผลให้อะตอมของธาตุและสารละลายหลายชนิดถูกจัดเป็นอนุมูลอิสระด้วย เช่น คลอรีนอะตอม ($Cl^{\cdot}$) เป็นต้น (Roberfroid and Calderon, 1995)

อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางด้านชีวภาพได้แก่ Hydroxyl radical ($HO^{\cdot}$) และ Superoxide anion radical ($O_2^{-\cdot}$) เป็นต้น อนุมูลเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก

2.3.2 กลไกในการเกิดอนุมูลอิสระ

กลไกในการเกิดอนุมูลอิสระมีหลายรูปแบบ ดังต่อไปนี้

ก. การแตกของพันธะโควาเลนท์แบบโฮโมไลซิส (Homolysis)

$$A : B \longrightarrow A^{\cdot} + B^{\cdot}$$

ข. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A + e^{-} \longrightarrow A^{-\cdot}$$

ค. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัวจากอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A \longrightarrow A^{+} + e^{-}$$

อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ ที่สามารถเป็นตัวตั้งต้นทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระได้อีกหลายชนิด สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species, RCS)

สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้ 2 กลุ่ม เช่น เปอร์ออกซีไนไตรท์ (Peroxynitrite) ตัวอย่างอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องแสดงในตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องบางชนิด (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2550)

Radicals	Non- Radicals
Reactive oxygen species (ROS)	
Superoxide, $O_2^{\cdot-}$	Hydrogen peroxide, H_2O_2
Hydroxyl, $OH^{\cdot}$	Hypochlorous acid, HOCl
Peroxyl, $ROO^{\cdot}$	Ozone, O_3
Alkoxyl, OR^{-}	Singlet oxygen $O^{\cdot}$
Reactive nitrogen species *(RNS)*	
Nitric oxide, NO	Nitrous acid, HNO_2
Nitrogen dioxide, NO_2	Dinitrogen trioxide, N_2O_3
Reactive chlorine species (RCS)	
Atomic chlorine $Cl^{\cdot}$	Hypochlorous acid, HOCl
	Chloramines
Chlorine gas, Cl_2	
Other	
Thioyl radical, $RS^{\cdot}$	

2.3.3 สาเหตุการเกิดอนุมูลอิสระ

ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีพ จะพบอนุมูลอิสระของออกซิเจนชนิดต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา การเกิดอนุมูลอิสระเหล่านี้ มีสาเหตุมาจากปัจจัยต่าง ๆ ทั้งภายในและภายนอกร่างกาย

2.3.3.1 ปัจจัยภายในร่างกาย

ร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีปฏิกิริยามากมายที่เกี่ยวข้องกับทั้งกระบวนการเมทาบอลิซึม ซึ่งถือเป็นสาเหตุหลักอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ตัวอย่างปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้แก่

1. ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเอง (Autooxidation) เช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมันซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ระยะ ดังนี้ (Nawar, 1996)

1) ระยะเหนี่ยวนำเริ่มต้น (initiation) เป็นระยะที่กรดไขมันแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระโดยมีแสงหรืออุณหภูมิเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการ

$$RH + \text{initiator} \longrightarrow R^{\cdot} + H^{\cdot} \qquad (1)$$

2) ระยะเพิ่มจำนวน (propagation) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซี่ (peroxy radical) (1) แล้วทำปฏิกิริยาต่อกับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydro peroxide) และอนุมูลอิสระ (2) ซึ่งถ้ามีแสงและความร้อนเป็นตัวเร่งจะเกิดปฏิกิริยาทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นแล้วอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นก็สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนใหม่ได้ต่อเนื่องไปเรื่อย ๆ ดังสมการ

$$R^{\cdot} + O_2 \longrightarrow ROO^{\cdot} \qquad (2)$$

$$ROO^{\cdot} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\cdot} \qquad (3)$$

3) ระยะสิ้นสุด (Termination) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นรวมตัวกันกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร ดังสมการ

$$R^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow RR \qquad (4)$$

$$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \longrightarrow ROOR + O_2 \qquad (5)$$

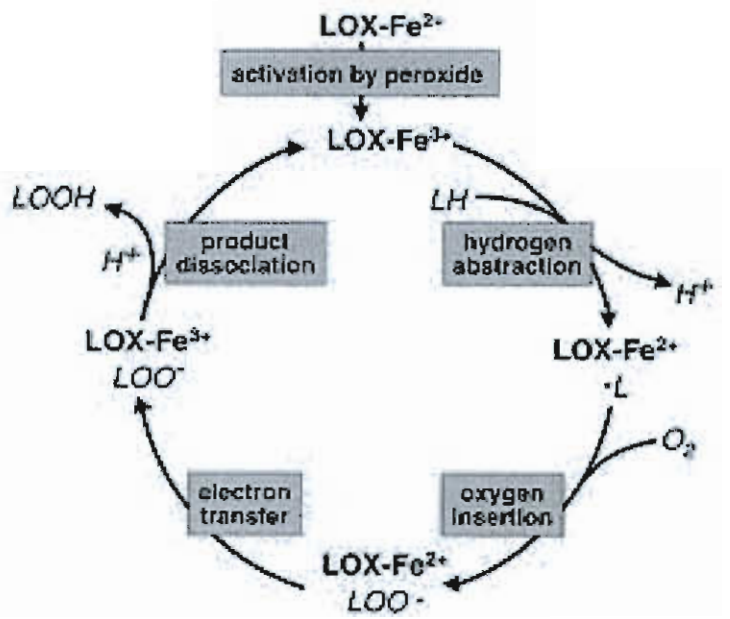
2. ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่มีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่ง การทำงานของเอ็นไซม์สำคัญ 2 ชนิด ที่มีผลกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระภายในร่างกาย (Halliwell et al., 1995) ได้แก่

1) เอ็นไซม์แซนธีนออกซิเดส (xanthine oxidase : XO) ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสลายเบสพิวรีน (purine) โดยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโพแซนธีน (hypoxanthine) เป็นแซนธีน (xanthine) และแซนธีนเป็นกรดยูริก (uric acid) พร้อม ๆ กับเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนให้ออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot -}$) ดังสมการ

$$\text{Hypoxanthine} + O_2 \xrightarrow{XO} \text{Xanthine } H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \qquad (6)$$

$$\text{Xanthine} + O_2 + H_2O \xrightarrow{XO} \text{Uric acid} + H_2O_2 \qquad (7)$$

2) เอ็นไซม์ไลโพออกซีจีเนส (lipoxygenase: (LOX)) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (polyunsaturated fatty acid) ภายในโมเลกุลของเอ็นไซม์นี้มีเหล็กเป็นส่วนประกอบอยู่ทำหน้าที่ดึงอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมันและเติมออกซิเจนให้กับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเพอรอกไซด์ซึ่งจะสลายตัวเป็นอนุมูลของกรดไขมันต่อไป ดังภาพที่ 2-2



ภาพที่ 2-2 การทำงานของเอ็นไซม์ Lipoxygenase ในปฏิกริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน โดย LH, ·L และ $LOO^{\cdot}$ คือ โมเลกุลของกรดไขมัน อนุมูลของกรดไขมัน และอนุมูลเปอร์ออกซีของกรดไขมัน ตามลำดับ (O'Donnell et al., 1999)

3. กระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว (Konstan & Berger, 1993) ในขั้นตอนการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยเฉพาะเชื้อโรคที่ถูกกลืนกินเข้ามาภายในร่างกายเซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีการดึงโมเลกุลออกซิเจน (O_2) มาใช้เป็นจำนวนมากเพื่อผลิตเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ $O_2^{\cdot -}$ โดยการทำงานของเอ็นไซม์ NADPH ออกซิเดส (NADPH oxidase) ที่อยู่บนเยื่อบุชั้นนอก (outer membrane) ของเม็ดเลือดขาว ดังสมการ

$$2O_2 + NADPH \xrightarrow{\text{NADPH oxidase}} 2O_2^{\cdot -} + NADP^+ + H^+ \qquad (8)$$

นอกจากนี้ในเม็ดสี (granule) ของเม็ดเลือดขาวยังมีเอ็นไซม์ไมอีโลเปอรอกซีเดส (myeloperoxidase) ทำให้เกิดอนุมูลไฮโปคลอรัส (hypochlorus, $HOCl^{\cdot}$) ซึ่งเป็นสารที่ทำลายจุลชีพได้ ดังสมการ

$$H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{\text{myeloperoxidase}} HOCl^{\cdot} + OH^- \qquad (9)$$

4. โลหะทรานสิชัน (transition metals) โลหะทรานสิชัน 2 ชนิดคือ เหล็ก (Fe^{2+}) และทองแดง (Cu^{2+}) ที่มีอยู่ทั่วไปในร่างกายสามารถเร่งการสร้างอนุมูลไฮดรอกซิลจากซูเปอร์

ออกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ในปฏิกิริยา Fenton (Fenton's reaction) ดังสมการ (Halliwell, 1999)

$$H_2O_2 + 2O_2^{\cdot\cdot} \xrightarrow{Fe^{2+}/Cu^{2+}} OH^{\cdot} + OH^{-} + O_2 \qquad (10)$$

2.3.3.2 ปัจจัยภายนอกร่างกาย

1. ยารักษาโรค ยาบางชนิดที่รับประทานเข้าไปในร่างกายสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาในกลุ่มต้านจุลชีพและต้านมะเร็ง เช่น บลีโอไมซิน (bleomycin), แอนทราไซคลินส์ (antracyclines) (Voest et al., 1994) และเมโธทรีเสต (methotrexate) (Gressier et al., 1994) เนื่องจากมีฤทธิ์เสริมปฏิกิริยาออกซิเดชัน (prooxidation)

2. รังสี การใช้รังสีรักษาโรค เช่น รังสีเอกซ์ (X- ray) รังสีแกมมา (γ-ray) อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายจากการถ่ายทอดพลังงานให้กับน้ำซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์แล้วก่อให้เกิดปฏิกิริยาขั้นต่อไป (secondary reaction) กับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในเซลล์นั้นได้อนุมูลอิสระเกิดขึ้น (Halliwell et al., 1995)

3. ควันบุหรี่ ในควันบุหรี่มีส่วนประกอบของสารไนตริกออกไซด์ (NO) ไนโตรเจนออกไซด์ (NO_2) และเพอรอกซีไนไตรท์ ($ONOO^-$) รวมทั้งสารมลพิษในชีวิตประจำวัน ได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) และคาร์บอนเตตะคลอไรด์ (CCl_4) ซึ่งจะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยการทำงานของเอ็นไซม์ไซโทโครม P-450 ไฮดรอกซีเลส (cytochrome P-450 hydroxylase) ที่มีอยู่มากในเซลล์ตับและพบได้บ้างในเซลล์ปอดและลำไส้เล็ก ทำให้เป็นสาเหตุของการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ดังกล่าว (Bast et al., 1991)

4. โอโซน โอโซนไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็นสารออกซิไดส์แรงสูงซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลได้จากการกระตุ้นของคลื่นแสง (Valacchi et al., 2004)

2.3.4 อนุมูลอิสระแรงสูง

2.3.4.1 อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot\cdot}$)

เป็นอนุมูลอิสระที่พบได้ในเซลล์ทั่วไป ส่วนใหญ่เกิดขึ้นระหว่างการขนส่งอิเล็กตรอนจากโมเลกุลของออกซิเจนไปยังโมเลกุลของน้ำภายในไมโตคอนเดรีย อนุมูลนี้จะไม่เข้าไปทำลายเซลล์โดยตรง แต่เมื่อเข้าไปแล้วจะทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยมี Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเฟนตัน ได้เป็นอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\cdot}$) ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ที่มีความว่องไวสูง นอกจากนี้ในสิ่งมีชีวิตยังสามารถสร้าง H_2O_2 จาก $O_2^{\cdot\cdot}$ ได้โดยปฏิกิริยา Dismutation ของเอ็นไซม์ Superoxide dismutase (SOD) (Akoh & Min, 1998) ดังสมการ

$$O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \qquad (11)$$

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ได้ แม้ไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระและจัดเป็นสารออกซิไดซ์ที่ไม่ทำปฏิกิริยาทำลายเซลล์แต่เป็นสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซิล และยังมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างอนุมูลไฮโปคลอรัส ($HOCl^{\bullet}$) ของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิล (Neutrophil) ที่ถูกกระตุ้นด้วยจุลชีพอีกด้วย โดยผลมาจากจากเอ็นไซม์ Myeloperoxidase ที่เก็บอยู่ในถุงไลโซโซม (Lysosome) (Davies, 1995) ดังสมการ

$$H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{\text{myeloperoxidase}} HOCl^{\cdot} + OH^- \qquad (12)$$

อนุมูลชนิดนี้สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีและสามารถสร้างอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้ เมื่อโลหะทรานซิชันอยู่ด้วย ดังสมการ

$$HOCl^{\cdot} + O_2^{\cdot -} \longrightarrow OH^{\cdot} + Cl^- + O_2 \qquad (13)$$

$$HOCl^{\cdot} + Fe^{2+} \longrightarrow OH^{\cdot} + Cl^- + Fe^{3+} \qquad (14)$$

2.3.4.2 อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$)

จัดเป็นสารออกซิไดส์แรงสูงที่มีความว่องไวมากที่สุด สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ ที่อยู่รอบข้างทันทีที่ถูกสร้างขึ้น อนุมูลนี้จึงเป็นอันตรายต่อสารชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิตมากกว่าอนุมูลอื่น ๆ (Halliwell, 1999) อนุมูลไฮดรอกซิลเกิดขึ้นจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีโลหะทรานซิชันอยู่ในระบบ โดยเหล็ก Fe^{2+} จะทำลายพันธะที่ยึดเหนี่ยวระหว่างออกซิเจนของสารเปอร์ออกไซด์ได้เป็นอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$) และไฮดรอกซิลไอออน(OH^-) ในปฏิกิริยาเฟนตัน ดังสมการ

$$Fe^{2+} + O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + O_2^{\cdot -} \qquad (15)$$

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (16)$$

$$Fe^{2+} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^- \qquad (17)$$

Fenton's reaction $\qquad Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^- \qquad (18)$

2.3.4.3 อนุมูลไนตริกออกไซด์ ($NO^{\bullet}$)

เป็นอนุมูลอิสระขนาดเล็กที่เป็นพิษกับปอด สามารถรวมตัวกับโลหะทรานซิชันหรือโปรตีนที่มีโลหะชนิดนี้เป็นองค์ประกอบ (Metalloprotein)ได้ อนุมูลไนตริกออกไซด์สามารถเข้าจับฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) ได้เร็วกว่าโมเลกุลออกซิเจนจนอาจเกิดการขัดขวางกระบวนการ

ขนส่งก๊าซออกซิเจนขึ้น (Stamler et al., 1992) นอกจากนี้ยังทำปฏิกิริยากับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้อย่างรวดเร็วเกิดเป็นอนุมูล Peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) ที่มีความว่องไวสูง (Huie & Padmaja, 1993) ในสภาวะที่มีออกซิเจน $NO^{\cdot}$ จะถูกออกซิไดซ์เป็น NO_2 ซึ่งเป็นสารมลพิษสามารถทำลายเซลล์ของถุงลม (Alveoli) และผนังหลอดเลือด (Vascular endothelium) ภายในปอดได้ (Stephens et al., 1972; Foubert et al., 1992)

2.3.5 ความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2550)

อนุมูลอิสระ มีบทบาทสำคัญในการเป็นสาเหตุของการเกิดโรคและเป็นปัจจัยทำให้โรคมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วและมีความรุนแรงยิ่งขึ้น โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวกับความบกพร่องของเซลล์ประสาทและระบบสื่อประสาทในสมอง และภาวะขาดเลือดของอวัยวะที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตซึ่งได้แก่ หัวใจและสมอง นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ เป้าหมายแรกที่อนุมูลอิสระทำให้เกิดความเสียหายและเป็นสาเหตุของการเกิดโรคคือ ชีวโมเลกุลที่สำคัญในร่างกายที่ไวต่อการถูกออกซิไดส์ ได้แก่ ลิพิดที่เป็นองค์ประกอบของเมมเบรน โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ รีเซพเตอร์ สารสื่อประสาท และดีเอ็นเอ ลิพิด โปรตีนและดีเอ็นเอ เป็นชีวโมเลกุลที่ถูกอนุมูลอิสระทำให้เกิดความเสียหาย ทั้งนี้เพราะชีวโมเลกุลเหล่านี้มีอิเล็กตรอนหรืออะตอมไฮโดรเจนที่หลุดออกได้ง่ายทำให้อนุมูลอิสระเข้าไปทำปฏิกิริยาโดยเข้าไปจับคู่กับอิเล็กตรอนของชีวโมเลกุลหรือดึงอิเล็กตรอนหรืออะตอมไฮโดรเจนออกจากชีวโมเลกุลนั้น ๆ นั่นคือชีวโมเลกุลเหล่านี้จะถูกออกซิไดส์โดยอนุมูลอิสระ ทำให้สมบัติและการทำงานของชีวโมเลกุลเปลี่ยนไป เกิดความบกพร่องหรือถูกทำลายอันเป็นเหตุของการเกิดโรค

กลไกความเสียหายจากอนุมูลอิสระ เกิดจากปฏิกิริยาหลายรูปแบบ ดังต่อไปนี้

2.3.5.1 กระบวนการลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน

ลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน เป็นกระบวนการที่ลิพิดพวกกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวและฟอสโฟลิพิดถูกออกซิไดส์โดยอนุมูลอิสระในลักษณะปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพหรือเสียสภาพ เกิดสารประกอบลิพิดไฮเปอร์ออกไซด์ขึ้นในเซลล์เมมเบรนหรือลิพิดในเลือดและในของเหลวในร่างกายอื่น ๆ อนุมูลอิสระเพียง 1 อนุมูลสามารถทำให้เกิดลิพิดเปอร์ออกไซด์จำนวนหลายร้อยโมเลกุลก่อนที่จะสิ้นสุดปฏิกิริยา เนื่องจากปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันสามารถเกิดขึ้นได้ง่ายที่เซลล์เมมเบรนซึ่งมีองค์ประกอบลิพิด 2 ชั้น ทำให้เกิดสารผลผลิตที่หลากหลาย

2.3.5.2 ปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ

อนุมูลอิสระมีบทบาทในปฏิกิริยาที่ทำให้โครงสร้างของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไปในลักษณะต่าง ๆ เช่น nicking การจับคู่เบสในดีเอ็นเอผิดไป การจัดเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ผิดไป

การหายไปของดีเอ็นเอบางส่วน การมีนิวคลีโอไทด์หรือดีเอ็นเอบางส่วนสอดแทรก และการเพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอ

ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในเซลล์และร่างกายซึ่งทำความเสียหายต่อดีเอ็นเอ ได้แก่ การเติมหมู่เมทิล การกำจัดหมู่พิวรีนและการกำจัดหมู่อะมิโน อนุมูลอิสระต่างชนิดกันจะมีผลต่อดีเอ็นเอในรูปแบบที่แตกต่างกัน เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะไม่ทำปฏิกิริยากับเบสในดีเอ็นเอ ในขณะที่อนุมูล ·OH สามารถทำปฏิกิริยากับเบสในดีเอ็นเอทั้งสี่ชนิดเกิดเป็นสารหลากหลายชนิด ส่วนอนุมูล O^{2-} จะทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับเบสกัวนีนเท่านั้น

2.3.5.3 ปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีน

การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนจะเพิ่มการเผาผลาญโปรตีน ซึ่งเป็นสารโมเลกุลใหญ่ได้เป็นสารโมเลกุลที่เล็กลง ผลที่ตามมาคือทำให้เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต เพราะจะมีผลกระทบต่อการทำหน้าที่ของร่างกาย โปรตีนเมื่อถูกออกซิไดส์ โครงสร้างของโปรตีนจะเปลี่ยนแปลงไปได้หลายรูปแบบ ทำให้โปรตีนเสียสภาพซึ่งจะมีผลทำให้เอ็นไซม์ รีเซพเตอร์และสารสื่อต่าง ๆ ซึ่งมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบไม่สามารถทำงานได้ตามปกติหรือมีประสิทธิภาพการทำงานลดลง

2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ (Halliwell, 2009) สารเหล่านี้เป็นสารประกอบที่ทนต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์ (Chattopadhyay et al., 2010) มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ดักจับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (Chelate) กับโลหะเพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ (Sies, 1991) สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลลิก (phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน (nitrogen compounds) และแคโรทีนอยด์ (carotinoids) (Velioglu et al., 1998) บทบาทสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระคือ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ของมนุษย์ และป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมคุณภาพในอาหาร

ปัจจุบันองค์กรที่เกี่ยวข้องในอุตสาหกรรมอาหารและยาได้พัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ เช่น สาหร่ายทะเล แบคทีเรีย เชื้อรา และพืชชั้นสูง (Chattopadhyay et al., 2010) อย่างไรก็ตามในภาวะปกติร่างกายคนจะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระอยู่แล้วซึ่งแบ่งออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนแรกร่างกายสร้างเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณอนุมูล

อิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และส่วนที่สองคือกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากวิตามินเอ ซี อี หรือเบต้าแคโรทีน (β-carotenoids) รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอลซึ่งเป็นพฤษเคมีที่สามารถพบได้ในพืชผักและผลไม้ ช่วยเสริมสร้างระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายให้มีประสิทธิภาพทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น (Shapoval and Gromovaia, 2003)

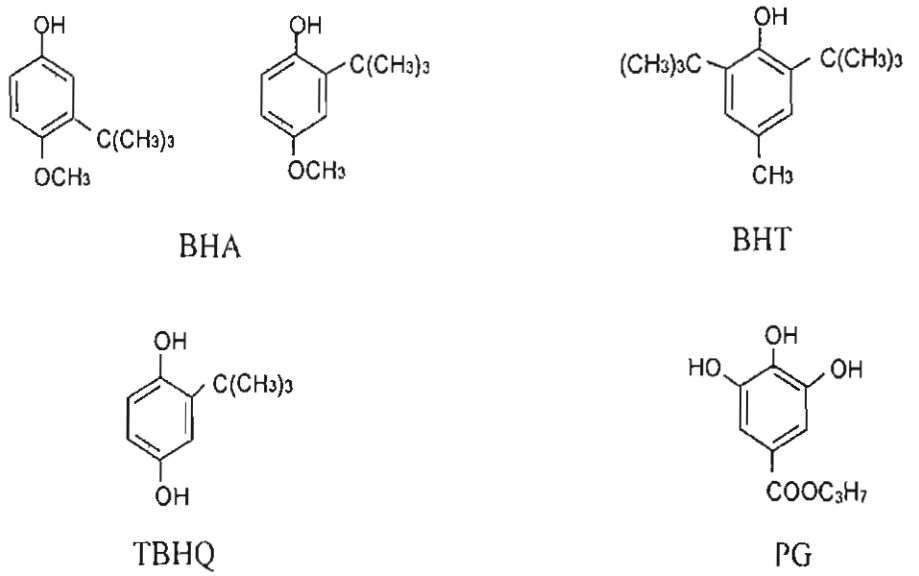
ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย ได้แก่ เอนไซม์คะตะเลส (catalase) กลูคาไธโอนเพอรอกซิเดส (glutathione peroxidase) และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) หรือสารประกอบ/โปรตีนบางอย่างเช่น อัลบูมิน (albumin) กลูตาไธโอน (glutathione) บิลิรูบิน (bilirubin) เซอรูโลพลาสมิน (cerulo- plasmin) ทรานสเฟอริน (transferrin) ยูบิควินอล (ubiquinol) และยูเรต (urate) เป็นต้น สารเหล่านี้มีหน้าที่ควบคุมอนุมูลอิสระต่าง ๆ ให้อยู่ในระดับพอเหมาะ แต่ถ้าเมื่อใดที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณมากเกินกว่าที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมด จะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า "oxidative stres" ขึ้น ภายใต้สภาวะดังกล่าวอนุมูลอิสระจะทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย ซึ่งถ้าสะสมมากอาจนำไปสู่ความผิดปกติหรือพยาธิสภาพหลายอย่าง

2.4.1 แหล่งที่มาและชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระ (Pokorny et al., 2001)

ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ได้มาจากพืช ผัก ผลไม้พวกองุ่น เครื่องเทศ และสมุนไพรได้รับความสนใจและศึกษากันอย่างกว้างขวางเนื่องจากกระแสเรื่องความปลอดภัยของสารสกัดจากธรรมชาติ สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิดได้แก่

2.4.1.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants)

สารประกอบฟีนอลิกสังเคราะห์ 5 ชนิดได้แก่ tertiarybutylhydroquinone, propyl gallate, 3-butylatehydroxyanisole, butylatedhydroxy toluene, 2-butylated hydroxyanisole ซึ่งสารเหล่านี้มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 2-3 โดยเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันซึ่งเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สีและรสชาติที่เปลี่ยนไป สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดในการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Yang et al., 2000; Pokorny et al., 2001)

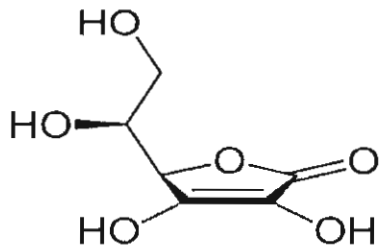


ภาพที่ 2-3 โครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ Propyl gallate (PG), 3-Butylated hydroxyanisole, 2-Butylated hydroxyanisole (BHA), Butylated hydroxytoluene (BHT), Tertiary butyl hydroquinone (TBHQ) (Howell & Saeed, 1999)

2.4.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มนี้พบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืช ซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามินและสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ สารเหล่านี้ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

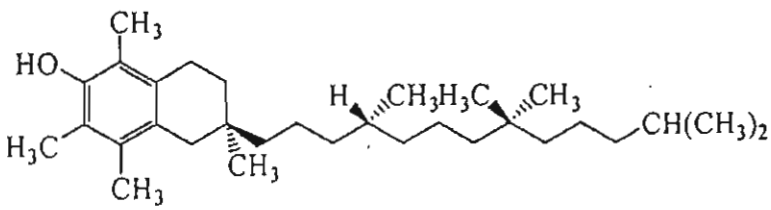
1. วิตามินซี มีสมบัติละลายน้ำได้ดี จึงทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์และอวัยวะที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิก ($AscH_2$) มีหมู่ไฮดรอกซี 2 หมู่ที่แตกตัวให้ไฮโดรเจนได้ปฏิกิริยาโดยรวมคือ การให้อิเล็กตรอน 1 ตัวร่วมกับอะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระเป็นการกำจัดหรือสลายอนุมูลอิสระคือ $R^{\cdot}$ ให้เป็น RH จากการกำจัดนี้จะได้อนุมูลอิสระตัวใหม่ที่มีความไวต่ำคือ $Asc^{\cdot-}$ แสดงดังภาพที่ 2-4



ภาพที่ 2-4 Ascorbic acid (วิตามินซี)

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/09/Ascorbic-acid-2D-skeletal.png)

2. วิตามินอี (Tocopherol) เป็นวิตามินที่ละลายได้ดีในไขมัน โครงสร้างมีหลายไอโซเมอร์ α- tocopherol ι(รูปที่ 2-5) เป็นไอโซเมอร์ที่มีฤทธิ์สูงสุดจากจำนวนไอโซเมอร์ทั้งแปด วิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลที่สำคัญของเมมเบรนซึ่งมีลิพิดเป็นองค์ประกอบ โดยป้องกันไม่ให้เกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน

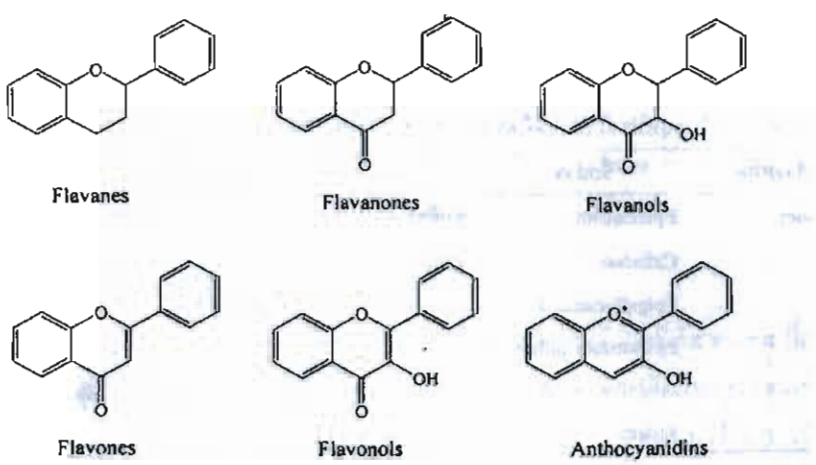


ภาพที่ 2-5 วิตามินอี (α- tocopherol) (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2550)

3) สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) จัดเป็นสารต้านอนุมูลที่ได้รับจากภายนอกและพบได้มากในธรรมชาติได้แก่ พืช ผัก ผลไม้ ชาเขียว ชาดำ ช็อกโกแลตและไวน์แดง เป็นต้น ปัจจุบันพบสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8,000 ชนิดในธรรมชาติ ทั้งที่เป็นโมเลกุลอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก ฟีนิลโปรพานอยด์ และฟลาโวนอยด์ และพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น ลิกนิน เมลานิน และแทนนิน เป็นต้น แม้ว่าสารกลุ่มฟีนอลิกในธรรมชาติจะมีปริมาณที่แตกต่างกัน แต่ปริมาณโดยเฉลี่ยที่คนได้รับต่อวันอยู่ในช่วงตั้งแต่ 20 มิลลิกรัม ถึง 1 กรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าปริมาณวิตามินอีที่ได้รับต่อวัน สารโพลีฟีนอลิกเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และไวรัส ต้านการอักเสบและการแพ้ มีสมบัติในการสลายลิ่มเลือด รวมทั้งเป็นสารต้านการก่อมะเร็ง ซึ่งสมบัติดังกล่าวนี้มีความสัมพันธ์กับสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวง

อะโรมาติกและมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซีอย่างน้อย 1 หมู่ ในที่นี้จะกล่าวถึงสารกลุ่มที่สำคัญ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์

สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่มตามความแตกต่างของสูตรโครงสร้าง โดยเฉพาะที่วงที่มีอะตอมออกซิเจนอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น อีเทอร์ คีโตน รวมทั้งการมีหมู่ไฮดรอกซีแทนที่บนวงอะโรมาติกในโมเลกุล ตัวอย่างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ ฟลาแวน(flanvanes) ฟลาวาโนน (flavanols) ฟลาวานอล (flavanols) ฟลาโวนอล (flavonols) ฟลาโวน (flavonoes) และแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) เป็นต้น โดยโครงสร้างของกลุ่มฟลาโวนอยด์บางชนิด แสดงดังภาพที่ 2-6



ภาพที่ 2-6 ตัวอย่างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2550)

2.4.2 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ

2.4.2.1 การดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging)

กลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระคือการทำให้โมเลกุลของอนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้น โดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ (Valacchi et al., 2004) ดังสมการ

$$R^{\cdot} + AH \longrightarrow RH + A^{\cdot} \qquad (19)$$

$$RO^{\cdot} + AH \longrightarrow ROH + A^{\cdot}$$

$$R^{\cdot} + A^{\cdot} \longrightarrow RA$$

$$RO^{\cdot} + A^{\cdot} \longrightarrow ROA$$

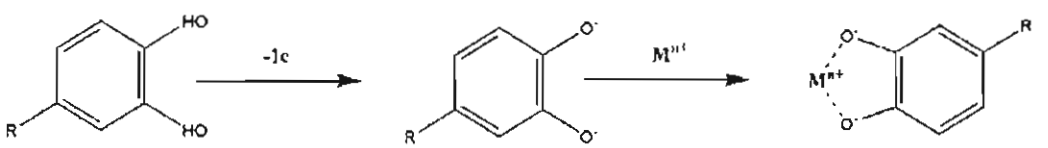
2.4.2.2 ยับยั้งการทำงานของซิงเกล็ทออกซิเจน (Singlet oxygen quenching, $^1O_2^*$)

สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) สามารถยับยั้งการทำงานของซิงเกล็ทออกซิเจน โดยการเปลี่ยน ($^1O_2^*$) ให้อยู่ในรูปทริปเปร็ท (triplet oxygen ($^3O_2$)) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน โดยแคโรทีนอยด์ (Car) หนึ่งโมเลกุลสามารถทำปฏิกิริยากับซิงเกล็ทออกซิเจนได้ถึง 1,000 โมเลกุล (Sies et al., 1992)

$$^1O_2^* + {}^1Car \longrightarrow {}^3O_2 + {}^1Car^* \longrightarrow {}^1Car^{*}\ {}^1Car + \text{thermal energy}$$

2.4.2.3 การจับกับโลหะที่สามารถเร่งสารกลุ่มนี้ได้แก่ ปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (metal chelation) (Sanchez-Moreno et al., 2000)

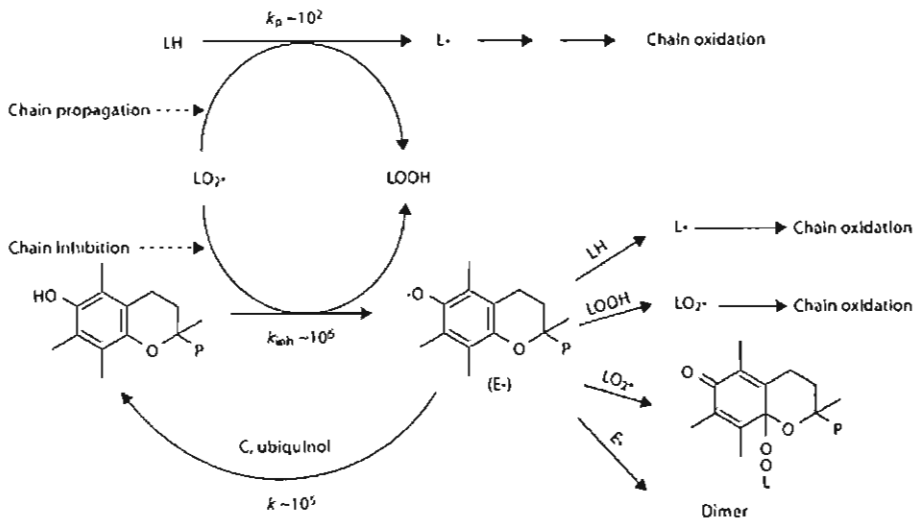
โลหะที่มีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระคือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} และสารที่สามารถจับกับโลหะเหล่านี้ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ กรดฟอสฟอริก และกรดซิตริก เป็นต้น กลไกการจับโลหะของสารประกอบฟลาโวนอยด์ แสดงดังภาพที่ 2-7



ภาพที่ 2-7 กลไกการจับโลหะของสารประกอบฟลาโวนอยด์

2.4.2.4 การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking)

วิตามินอี (α-tocopherol; Toc-OH) สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid autooxidation) โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron-acceptor antioxidants) จากอนุมูล peroxyl (ROO^*) (Burton & Traber, 1990)



ภาพที่ 2-8 การทำงานของวิตามินอี ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในไขมัน
(www.karger.com/Article/Fulltext/343104)

2.4.2.5 การเสริมฤทธิ์ (synergism)

สารชนิดนี้ช่วยให้สารต้านอนุมูลอิสระทำงานได้ดีขึ้น เช่น การทำงานร่วมกันระหว่างวิตามินอี (alpha-tocopherol) กับวิตามินซี โดยวิตามินซีไม่สามารถทำงานในสภาวะไม่มีขั้ว (hydrophobic condition) ได้เหมือนกับวิตามินอี แต่วิตามินซีจะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูล alpha-tocopherol peroxyl ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างวิตามินอีกับอนุมูลเปอร์ออกซิล ($ROO^{\cdot}$) เพื่อเปลี่ยนรูปกลับไปเป็นวิตามินอีที่สามารถทำงานได้ (Frankel, 1998)

2.4.2.6 การยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition)

สารประกอบฟีนอลิกบางชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก (phenolic acid) และแกลเลต (gallates) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิโพออกซีจีเนส (lipoxygenase) โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นมีสมบัติเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ซึ่งจะส่งผลให้เอ็นไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้ (Puerta, 1999)

2.5 เทคนิคแอบซอบชันสเปกโตรสโกปี (Absorption Spectroscopy)

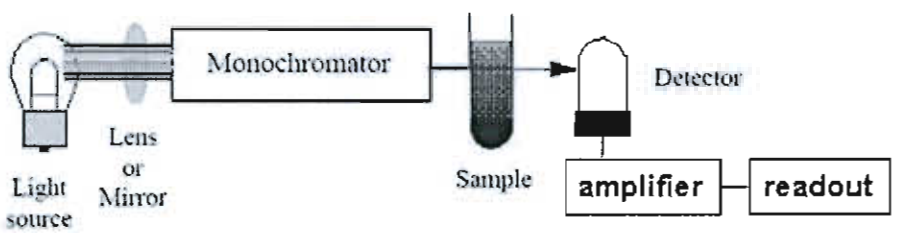
แอบซอบชันสเปกโตรสโกปีเป็นเทคนิคการวิเคราะห์สาร โดยอาศัยหลักการดูดกลืนแสง (Light absorption) ของสาร ซึ่งสามารถใช้วิเคราะห์สารทั้งในเชิงปริมาณ (Quantitative analysis)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

และเชิงคุณภาพ (Qualitative analysis) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ดำเนินการได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ และใช้สารปริมาณน้อย ในระดับไมโครกรัมหรือนาโนกรัม จึงนำมาประยุกต์ใช้ในวิทยาศาสตร์เกือบทุกสาขา ทั้งวิทยาศาสตร์ชีวภาพและกายภาพ เช่น ทางการแพทย์ เคมี เภสัชศาสตร์ เกษตรศาสตร์ และสิ่งแวดล้อม เป็นต้น สารที่สามารถดูดกลืนแสงหรือรังสีในช่วงอัลตราไวโอเลต และวิสิเบิล ซึ่งอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 190-800 นาโนเมตรนั้น ได้แก่ สารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อน สารอนินทรีย์ทั้งที่มีสีและไม่มีสี สารที่มี Unsaturated functional group สามารถดูดกลืนแสงในช่วง UV-Visible ได้ โดยการวิเคราะห์อยู่ในรูปของธาตุหรือโมเลกุลก็ได้ แต่ในกรณีที่จะพิสูจน์ว่าสารตัวอย่างนั้นเป็นสารอะไร มีโครงสร้างอย่างไร อาจต้องใช้เทคนิคอย่างอื่นด้วยเพื่อการยืนยันเช่น เทคนิค IR, NMR หรือ Mass spectroscopy (แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม, 2535)

2.5.1 การประยุกต์ใช้เทคนิคแอบซอบชันสเปกโตรสโกปีในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

ในการวัดปริมาณของแสงที่ถูกดูดกลืนด้วยสารตัวอย่างนั้น ทำได้โดยให้ลำแสงผ่านเข้าไปในสารตัวอย่าง แล้ววัดปริมาณของแสงที่ผ่านทะลุออกมา โดยเปรียบเทียบกับแสงที่ทะลุออกมาเมื่อไม่มีสารตัวอย่าง ดังภาพที่ 2-11



ภาพที่ 2-9 หลักการวิเคราะห์สารโดยเทคนิคแอบซอบชันสเปกโตรสโกปี
(http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php)

การดูดกลืนของแสงจะเป็นไปตามกฎของเบียร์และแลมเบิร์ต (Beer-Lambert's Law) คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้นของสาร ดังสมการ

328662

$$A = \pounds bc = \log P_0/P_1 \qquad (20)$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance, A หรือ Optical Density, O.D)

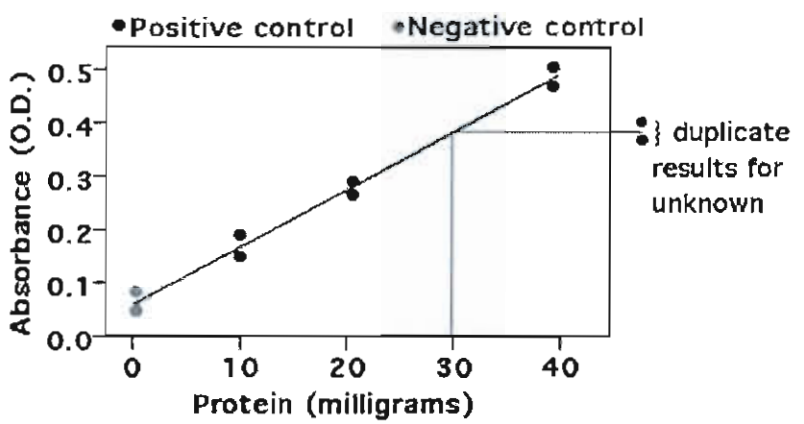
P_0/P_1 = ความเข้มข้นของแสงก่อนและหลังจากผ่านสารละลาย ตามลำดับ

C = ความเข้มข้นของสาร

b = ระยะทางที่แสงผ่าน

£ = ค่าคงที่ของการดูดกลืนแสง

จากสมการข้างต้น ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) จะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้น C ของสาร เมื่อค่า b มักมีค่าเป็น 1 เซนติเมตร (ความกว้างของเซลล์ที่บรรจุสาร) จากหลักการนี้นำมาใช้เพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ไม่ทราบค่าได้ โดยเตรียมสารละลายชนิดนั้นที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนตั้งแต่ 3 ค่าขึ้นไป เป็นสารละลายมาตรฐาน (Standard solution) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม แล้วเขียนกราฟมาตรฐาน (Standard or Calibration curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงที่วัดได้และความเข้มข้น จะได้กราฟเส้นตรงซึ่งต้องมีจุดเริ่มต้นที่ศูนย์ (Origin) จากนั้นจึงนำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทราบค่าความเข้มข้น ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกัน นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานก็จะทราบค่าความเข้มข้นของสารละลายชนิดนั้น ๆ ดังแสดงในภาพที่ 2-10



ภาพที่ 2-10 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นที่ของสารละลายมาตรฐานและการใช้ประโยชน์เพื่อหาค่าเข้มข้นของสารตัวอย่าง (http://en.wikipedia.org/wiki/Standard_curve)

2.6 แก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมทรี (Gas chromatography/Mass spectrometry)

2.6.1 หลักการแก๊สโครมาโทกราฟี

แก๊สโครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคที่ใช้แก๊สเฉื่อยทำหน้าที่เป็นแก๊สพา เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ นำมาประยุกต์ใช้แยกสารที่ระเหยง่าย และมีความเสถียรภาพทางความร้อน ในเทคนิคนี้สารตัวอย่างจะถูกนำเข้าสู่ระบบและเกิดการระเหยเป็นไอที่จุดฉีดสาร โดยใช้คอมพิวเตอร์ควบคุมและสื่อสารกับส่วนประกอบต่าง ๆ รับสัญญาณข้อมูลจากดีเทคเตอร์ตลอดจนใช้ประมวลผล และการออกรายงานผลไปที่เครื่องพิมพ์

2.6.2 หลักการแมสสเปกโทรเมทรี

แมสสเปกโทรเมทรี เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบที่ไม่ทราบชนิด และใช้ในการศึกษาโครงสร้างของโมเลกุลได้เป็นอย่างดี โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของมวลที่มีประจุ ซึ่งหมายถึงไอออนในสนามไฟฟ้าหรือสนามแม่เหล็ก พฤติกรรมการเคลื่อนที่ดังกล่าวขึ้นอยู่กับค่ามวลต่อประจุของไอออน นอกจากนี้การทราบประจุของไอออนจะทำให้สามารถทราบค่ามวลของไอออนนั้น ๆ ได้

2.6.3 หลักการแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมทรี

เป็นเทคนิคการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสาร โดยรวม 2 เทคนิคคือ การแยกสารผสมซึ่งกลายเป็นไอได้ง่ายให้ออกเป็นองค์ประกอบเดี่ยว ๆ ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการแยกสาร จากนั้นองค์ประกอบของสารแต่ละชนิดที่ผ่านการแยกจะถูกตรวจวัดด้วยวิธีแมสสเปกโทรเมทรี ที่มีความจำเพาะต่อการตรวจวัด มีสภาพไวในการตรวจวัดสูง และให้ข้อมูลแมสสเปกตรัมของสารที่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์สารได้อย่างมีประสิทธิภาพ (แม้นอมรสิทธิ์ และคณะ, 2555)

2.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชตัวอย่าง

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชตัวอย่าง ได้ดัดแปลงวิธีการมาจากการทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารต้านจุลินทรีย์หรือยาปฏิชีวนะ (Koneman et al., 1994) ซึ่งสามารถแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 วิธี คือ Dilution Method และ Diffusion Method มีรายละเอียด ดังนี้

1. Dilution Method

Dilution Method เป็นวิธีหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยจะเรียกความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์นี้ว่า Minimal Inhibition Concentration หรือ MIC ซึ่งการวิเคราะห์หา MIC สามารถทำได้โดยการเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธี (Ingraham, Ingraham, & Harriett, 1995) คือ การเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ในของเหลว (Broth Dilution Method) และการเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารแข็ง (Agar Dilution Method) ซึ่ง Dilution Method จะให้ผลที่ละเอียดกว่า Diffusion Method แต่ขณะเดียวกันก็ต้องใช้เวลา เครื่องมือ และแรงงานในการทำการทดลองมากกว่า

2. Diffusion Method

Diffusion Method เป็นวิธีการทดสอบความไวของสารต้านจุลินทรีย์ ในการยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอาศัยหลักการที่ว่าสารจะซึมจากที่มีความเข้มข้นสูงไปยังที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นจึงนำสารต้านจุลินทรีย์ซึ่งอยู่ในรูปแผ่นยาที่เป็นกระดาษกรองหรือเม็ดยาวางบนอาหารเลี้ยงเพื่อซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์อยู่ ซึ่งที่นิยมมากที่สุดก็คือ วิธีที่ใช้แผ่นกระดาษกรอง (Disc Diffusion Method หรือ Filler Paper Disc) และการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นสามารถสังเกตได้จากการที่จุลินทรีย์จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในบริเวณโดยรอบที่มีสารต้านจุลินทรีย์อยู่ (Tortora, Berdell, & Christine, 1995) Diffustion Method เป็นที่นิยมกันมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกประหยัดค่าใช้จ่าย และใช้เวลาทดลองน้อย แต่วิธีนี้ไม่สามารถอ่านผลได้โดยตรงเป็นค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

จากที่กล่าวมาแล้วนั้น จะเห็นได้ว่าการที่จะเลือกการทดสอบวิธีใดนั้น จะต้องพิจารณาจากความละเอียดที่ผู้ทดลองต้องการจำนวนสารสกัดที่จะทดสอบ ปริมาณของสารสกัดที่มีอยู่ตลอดจนแรงงานงบประมาณในการทดลอง โดยการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกวิธีที่เหมาะสมกับการทดลองคือ Diffusion Method

2.7.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์โดย Diffusion Method

Diffusion Method เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบความไวในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลินทรีย์ วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบกับสารต้านจุลินทรีย์เพียงความเข้มข้นเดียวเท่านั้น โดยอาศัยหลักการที่ว่า เมื่อใส่สารต้านจุลินทรีย์ปริมาณหนึ่งไว้ในภาชนะบรรจุ (Reservoir) ซึ่งอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar Medium) ที่เพาะเชื้อจุลินทรีย์ไว้ ภายหลังจากการบ่มเพาะเชื้อ

ให้สังเกตดูรอบบริเวณภาชนะ ที่ตัวสารต้านจุลินทรีย์ซึมไปนั้นจะมีบริเวณใส (Clear Zone) ที่ไม่มีเชื้อเจริญเติบโต โดยบริเวณใสนี้เรียกว่า Inhibition Zone แล้ววัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น เพราะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้นจะมีขนาดแคบกว้างแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้นนั้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบอีกด้วย (Mckane, Larry, & Kandel, 1996)

ในอดีตนั้น Diffusion Method เริ่มต้นด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน แล้วใช้แท่งแก้วหรือแท่งเหล็กเจาะบนผิววุ้นให้มีช่องเกิดขึ้น จากนั้นเติมสารละลายของสารต้านจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ ใส่ลงไปในช่องวุ้นเหล่านั้นสารต้านจุลินทรีย์จะแพร่กระจายไปในเนื้อวุ้น โดยสารต้านจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ชนิดนั้น จุลินทรีย์จะไม่เจริญบริเวณรอบ ๆ บริเวณที่มีสารต้านจุลินทรีย์ดังกล่าวอยู่ ซึ่งหากมีบริเวณที่ถูกยับยั้งมากนั้น หมายถึง สารต้านจุลินทรีย์หรือยาชนิดนั้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดนั้นมาก ต่อมาในปี ค.ศ. 1960 ได้มีการพัฒนาวิธีการใหม่ โดย Alcamo (1997) โดยใช้แผ่นกระดาษกรองหรือกระดาษกรองวงกลม (Filter Paper Disc) ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้กันมาก บางครั้งอาจเรียกวิธีการทดสอบที่ใช้แผ่นกระดาษดังกล่าวนี้ว่า Kirby – Bauer Test หรือ Disc Sensitivity Test

ดังจะเห็นได้ว่า Diffusion Method เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในการทดสอบความไวต่อจุลินทรีย์ของสารต้านจุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ใช้ค่าใช้จ่าย แรงงานและเวลาในการทำการทดลองน้อย แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดหลายประการด้วยกัน อาทิเช่น วิธีนี้ไม่สามารถใช้ในการทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งมีอัตราเร็วในการเจริญเติบโตต่ำ หรือเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต และเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้เฉพาะแต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดเป็นต้น นอกจากนี้วิธีการทดสอบนี้ยังไม่สามารถอ่านผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้โดยตรง

2.7.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์โดย Diffusion Method

ปัจจัยหลายชนิดที่มีผลต่อขนาดบริเวณใสที่เกิดจากสารต้านจุลินทรีย์นั้น โดยบางปัจจัยจะรบกวนการออกฤทธิ์หรือการดูดซึมของสารต้านจุลินทรีย์ หรือบางปัจจัยที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์มากก็จะทำให้ขนาดบริเวณใสลดลงได้ ส่วนบางปัจจัยที่ส่งเสริมการออกฤทธิ์หรือการดูดซึมสารต้านจุลินทรีย์ หรือพวกที่รบกวนการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก็จะทำให้บริเวณใสนี้เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงควรตระหนักถึงปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ ซึ่งปัจจัยที่สำคัญ มีดังนี้

2.7.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ สารต้านจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ นั้นจะได้รับผลกระทบจากส่วนประกอบต่าง ๆ ที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน โดยมีตัวอย่างดังนี้

1) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ส่วนมากจะเจริญเติบโตได้ดีที่ pH 6.8 -7.2 แต่ถ้า pH ต่ำหรือสูงกว่าระดับนี้ จะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ (Pelczar, 1958)

2) บัฟเฟอร์ (Buffer) ในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดนั้น อาจมีผลกระทบต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์บางชนิดได้ เช่น การทดสอบ Gentamicin ในอาหารซึ่งมีความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่างกันก็จะทำให้ได้ผลการตรวจสอบความไวที่แตกต่างกัน นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดก็สามารถอยู่ได้ในที่ที่มี pH ในช่วงแคบ ๆ ถ้า pH สูงหรือต่ำกว่านี้ก็จะทำให้ตายได้ เช่น *Legionella pneumophia* สามารถอยู่ได้ที่ pH 6.85-7.00 ดังนั้นจึงต้องใช้บัฟเฟอร์ช่วย เพื่อไม่ให้ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ๆ เปลี่ยนแปลงไปมากนัก (Nester, Evans, & Martha, 1995)

3) ปริมาณอิออนที่ปรากฏในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลกระทบต่อความไวของเชื้อและการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ต่อเชื้อจุลินทรีย์ได้ เช่น ผลของ Aminoglycoside ที่ทำให้บริเวณใสของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ลดลง นอกจากนี้สำหรับยา Tetracyclines ฤทธิ์ของยาจะลดลง เมื่อปริมาณของ Divalent Cation เช่น Ca^{2+} และ Mg^{2+} เพิ่มขึ้น (Koneman et al., 1994)

4) วุ้น (Agar) วุ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น จะมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบของ Polysaccharides ซึ่งสารต้านจุลินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น Cationic จะสามารถจับกับหมู่ Acidic Sulfate ของ Polysaccharides ในวุ้นได้ จึงมีผลทำให้การออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์นั้นลดลงได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับยาในกลุ่ม Polymyxins (Brown & Gilbert, 1995)

5) ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar Medium) โดยทั่วไปจะกำหนดให้มีความหนาประมาณ 4 มิลลิเมตร ซึ่งไม่ทำให้กระทบต่อขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นมากนัก โดยการเทอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาด 25 และ 60 มิลลิลิตร ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Plate) ที่เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 9 และ 15 เซนติเมตร ตามลำดับ จะทำให้ได้ความหนาดังกล่าว ส่วน Plate ที่เท Agar ไว้แล้ว ถ้าต้องการเก็บไว้ใช้เกิน 5 วัน ควรใส่ถุงพลาสติกแล้วไว้ในที่มีอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส แต่ไม่ควรเก็บเกิน 2 สัปดาห์ และก่อนใช้ควรให้พื้นผิว Agar แห้งเสียก่อน (Collins, Lyne, & Grange, 1989)

6) ความชื้นหรือน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีบทบาทโดยตรงต่อจุลินทรีย์เกี่ยวกับแรงดันออสโมซิสของเซลล์ เพราะผลของแรงดันออสโมซิสที่มีต่อจุลินทรีย์นั้นจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายและชนิดของจุลินทรีย์นั้น ๆ เช่น เซลล์ของ *Escherichia coli* น้ำจะแพร่ออกนอกเซลล์ (Plasmolysis) เมื่อเจริญในสารละลายซูโครสเข้มข้น 12 เปอร์เซนต์ เป็นเวลานาน

5-20 นาที ส่วนเซลล์ของแบคทีเรียพวก *Bacillus* มีความสามารถทนต่อสารละลายของเกลือเข้มข้น 10-15 เปอร์เซนต์ หรือสารละลายน้ำตาลเข้มข้น 30-60 เปอร์เซนต์ ได้ดี (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2536)

2.7.2.2 ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบนั้น มีผลต่อการทดสอบเป็นอย่างมาก เช่น การใช้เชื้อจุลินทรีย์มากเกินไปจะทำให้บริเวณใสมีขนาดเล็กเกินไปได้ ดังนั้น การทดสอบทุกครั้งจึงต้องมีการปรับปริมาณของเชื้อทดสอบให้อยู่ในปริมาณที่แน่นอน และเป็นมาตรฐาน เช่น การปรับปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบให้ความเข้มข้นประมาณ 1.5×10^9 เซลล์/มิลลิลิตร โดยเทียบกับ 0.5 McFarland standard (Koneman et al., 1994)

2.7.2.3 ความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ใน Disc ที่ใช้ทดสอบ ในกรณีที่ใช้แผ่นกระดาษกรอง (Disc) ที่มีสารต้านจุลินทรีย์ที่เตรียมขึ้นเอง โดยการชุบ Disc ลงในสารต้านจุลินทรีย์ อาจจะมีผลทำให้ปริมาณความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ใน Disc แต่ละอันแตกต่างกัน และจะส่งผลต่อขนาดของบริเวณใสที่เกิดจากสารต้านจุลินทรีย์ได้โดยตรง

2.7.2.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อมีผลกระทบอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งโดยปกติจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (Psychrophilic Bacteria) และแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 75 องศาเซลเซียส (Thermophilic Bacteria) และแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิประมาณ 20-45 องศาเซลเซียส (Mesophilic Bacteria) ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียที่สามารถก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์ เช่น *Salmonella typhi* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น (Pelezar, 1958) ดังนั้นแล้วอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิด จึงควรปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยจะใช้อุณหภูมิในการบ่มเชื้อประมาณ 35-37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิเฉลี่ยของสัตว์เลือดอุ่น (Kleyn & Bicknell, 1999)

2.7.2.5 เวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อ เวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และการซึมของสารต้านจุลินทรีย์ใน Agar Medium ได้ ดังนั้นภายหลังวาง Disc แล้วควรนำ Plate ที่ได้เข้าตู้บ่มเชื้อทันที แล้วบ่มเชื้อเป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง (Collins, Lyne, & Grange, 1989)

2.7.2.6 บรรยากาศขณะบ่มเชื้อ บรรยากาศขณะบ่มเชื้อมีผลต่อการทดสอบเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะเมื่อบ่มเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ จะทำให้เกิด Carbonic acid บนพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดสภาวะกรดขึ้น ซึ่งจะมีผลต่อจุลินทรีย์ และการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์บางชนิด (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2536)

2.7.2.8 การวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น การวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น มีความสำคัญอย่างมากที่จะทำให้ผลที่แปรออกมาผิดหรือถูกได้เช่นกัน โดยทั่วไปการวัดขนาดบริเวณใสต้องการความละเอียดเป็นค่ามิลลิเมตร ซึ่งจะวัดได้โดยใช้ไม้บรรทัดคาลิปเปอร์ หรือเครื่องมือไฟฟ้า นอกจากนี้การที่ขอบบริเวณส่วนใสไม่ชัดเจน คือ ขอบริม ๆ ที่ยังมีเชื้อจุลินทรีย์ยังเจริญประปรายหรือเชื้อจุลินทรีย์ถูกยับยั้งไม่หมด การวัดขนาดบริเวณใสในลักษณะนี้จะต้องวัดเฉพาะขอบนอกที่ใสสม่ำเสมอ (Ingraham & Ingraham, 1995)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Vijayalakshmi and Sarada (2008) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ ใบ เปลือกลำต้น และรากเอื้องหมายนา ในตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เมทานอล เอทานอลและไดคลอโรมีเทน โดยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay โดยใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน และด้วยวิธี ABTS โดยใช้แกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิล รวมทั้งหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ผลการทดลองพบว่า สารประกอบฟีนอลรวมและเปอร์เซนต์การต้านอนุมูลไฮดรอกซิลในส่วนสกัดเมทานอลจากรากและเปลือกลำต้นมีปริมาณสูงเมื่อเทียบกับส่วนใบ

Jha et al. (2010) ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเหง้าเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเมทานอล โดยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH, ไนตริกออกไซด์, สารฟลาโวนอยด์ โดยใช้กรดแอสคอบิกหรือวิตามินซีเป็นสารมาตรฐานและสารควอซีติน ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเหง้าเอื้องหมายนามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้จากผลการทดลองพบว่าความทนทานต่อพิษของกุ้งมีค่า LC_{50} เท่ากับ 31.55 มิลกรัมต่อมิลลิลิตร

Mehmood et al. (1984) ได้ทำการศึกษาโดยการแยกองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดเอื้องหมายนาและได้รายงานว่า พบสารประกอบ quinone ใหม่ คือ -dihydrophytylplastoquinone และ 6-methyl ต่อเป็นสายตรงกับ alpha-tocopherolquinone

Anonymous (2007) ได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันจากเมล็ดเอื้องหมายนา โดยสมบัติของน้ำมันที่ได้มีดังนี้

Specific gravity	0.9125	Refractive index	1.4672
Acid value	23.84	Saponification value	179.84
Iodine value	76.4		

โดยกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบ คือ กรด Palmitic 55.9 เปอร์เซนต์, กรด stearic 8.3 เปอร์เซนต์, กรด oleic 22.75 เปอร์เซนต์, กรด linoleic 6.8 เปอร์เซนต์ และ arachidic 1.7 เปอร์เซนต์

Chen et al. (2008) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของพืชตระกูลขิงที่พบในประเทศไต้หวัน โดยทำการศึกษาเหง้าของพืชตระกูลขิงทั้งหมด 18 ชนิด จำนวน 5 วงศ์ คือวงศ์ *Alpinia* 9 ชนิด วงศ์ *Costus speciosus* (Koenig) Smith 1 ชนิด วงศ์ *Curcuma* 4 ชนิด วงศ์ Hedychium 1 ชนิด วงศ์ *Vanoverberghia sasakiana* 1 ชนิด และวงศ์ *Zingiber* 2 ชนิด นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล แล้วนำไปหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยวิธี Folin-Ciocalteau method ทดสอบความสามารถในการขจัด 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) ทดสอบ reducing power และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่า พืชในวงศ์ *Alpinia* และ genus *Curcumas* มีปริมาณฟีนอลิกรวมเฉลี่ย 17.01 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 30.02 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และพบค่าสูงที่สุดใน *Vanoverberghia sasakiana* คือ 36.50 มิลลิกรัมต่อกรัม ปริมาณสารต้านออกซิเดชันมีฤทธิ์ต้านที่ดี (89 เปอร์เซนต์) ในวงศ์ *Vanoverberghia* และ *Hedychium* ส่วนฤทธิ์ด้าน DPPH มีค่าใกล้เคียงกัน โดยในวงศ์ *Zingiber oligophyllum* พบในปริมาณต่ำที่สุด นอกจากนี้พืชที่ทดสอบส่วนใหญ่ต้านแบคทีเรียได้ แต่วงศ์ *Hedychium* และวงศ์ *Vanoverberghia* ไม่สามารถด้านเชื้อ *Escherichia coli* และ *Vibrio parahaemolyticus*

จักรพันธ์ จุลศรีไกวัล และคณะ (2549) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชวงศ์ Zingiberaceae จำนวน 5 ชนิดได้แก่ ข่า (*A. galanga* (L.) Swartx.) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ขมิ้นขาว (C.*mangga* Val. & Zijp.) ไพล (Z. *cassumunar* Roxb.) ไพลดำ (Z.*ottensii* Valeton.) โดยศึกษาการสกัด 2 แบบได้แก่ สารสกัดน้ำ สารสกัดแอลกอฮอล์ ทำการสกัดโดยวิธี continuous extraction และน้ำมันหอมระเหยเตรียมโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (2,2'-azinobis–(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) เปรียบเทียบกับ Trolox (milligram of trolox per gram of sample) ผลการทดลองพบว่า สารสกัดแอลกอฮอล์ของขมิ้นชัน น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดน้ำของไพล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดในกลุ่ม โดยมีค่าเท่ากับ 187.543, 56.469 และ 32.058 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

นิติมา วงศ์วัฒนานุกูล และคณะ (2549) ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหย (essential oil) และสารหอม (absolute) จากพืชหอมและเครื่องเทศไทยจากพืช 12 วงศ์ จำนวน 19 ชนิด โดยการวัดความสามารถในการขจัดอนุมูล 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) เปรียบเทียบสารมาตรฐาน 3 ชนิดคือ trolox, quercetin และ keampferol น้ำมันหอมระเหยสกัดโดยการกลั่นด้วยน้ำ ส่วนสารหอมสกัดโดยตัวทำละลาย ผลการศึกษาพบว่า น้ำมันกระเพรา (*Ocimum Sanctum* Linn.) มีฤทธิ์ที่ดีที่สุด มีค่า IC_{50} = 0.6294 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ น้ำมันไพล

(*Z. cassumunar* Roxb.) IC_{50} = 1.0599 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำมันขิง (*Z. officinale*) IC_{50} = 4.395 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

รัชนก เชื้อเตชะ และคณะ (2549) ได้รายงานการสกัดสารที่สำคัญจากส่วนลำต้นใต้ดิน ลำต้นและใบของพืชสมุนไพรหน่อกะลา (*Alpinia nigra* B.L. Burtt.) ในวงศ์ Zingiberaceae โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ทดสอบสมบัติต้านออกซิเดชันของสารสกัดที่ได้โดยวิธีบีต้า-แคโรทีน/กรดนิโนเลอิก และการกำจัดอนุมูล DPPH จากการศึกษาสมบัติต้านออกซิเดชันโดยวิธีบีต้า-แคโรทีน/กรดนิโนเลอิกพบว่า สารสกัดจากส่วนใบและลำต้นแสดงสมบัติต้านออกซิเดชันสูงสุดโดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 12.517 และ 13.260 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสมบัติการกำจัดอนุมูล DPPH พบว่า สารสกัดส่วนใบมีสมบัติกำจัดอนุมูล DPPH สูงกว่าส่วนสกัดจากส่วนอื่นๆ และให้ค่าสูงกว่าสารสกัดจากข่า จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า หน่อกะลาสามารถเป็นแหล่งของสาระสำคัญที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชันได้

ศศิธร อุทธตรี (2549) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันโดยวิธีการกำจัดอนุมูล DPPH และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดเอทานอลจากลำต้นใต้ดินของพืชวงศ์ Zingiberaceae 4 ชนิดได้แก่ เร่ว (*Amomum xanthioides* Wall.) กระวาน (*Amomum krevanh* Pierre.) ว่านชักมดลูก (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) และกระทือ (*Zingiber zerumbet* Smith.) พบว่าส่วนสกัดของว่านชักมดลูกมีค่า IC_{50} เท่ากับ 292.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ เร่ว กระทือ และกระวานมีค่า IC_{50} เท่ากับ 779.62, 824.68 และ 1,162.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนฤทธิ์ reducing power ของส่วนสกัดจากพืชทุกชนิดมีลักษณะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารทดสอบ โดยว่านชักมดลูกมีค่า reducing power สูงอย่างเด่นชัดที่ความเข้มข้น 500 ถึง 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสกัดว่านชักมดลูก กระทือ เร่วและกระวานมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเท่ากับ 103.5, 46.6, 38.6 และ 22.1 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัดตามลำดับ

กันญารัตน์ ภิรมย์มั่น (2550) ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดย่อยน้ำของต้นกระทือป่า (*Zingiber thorelii* Gagnep.) และว่านริดสีดวง (*Curcuma* sp.) โดยทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH และทดสอบฤทธิ์การรีดิวซ์เปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐานคือ บีเอชที (Butylated hydroxyltoluene; BHT) และกรดแอสคอร์บิก ผลการศึกษาพบว่า ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทของต้นกระทือป่ามีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH และมีฤทธิ์ในการรีดิวซ์สูงที่สุดรองลงมาคือ ส่วนสกัดย่อยน้ำ > ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของว่านริดสีดวงมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH และฤทธิ์ในการรีดิวซ์สูงที่สุด รองลงมาคือส่วนสกัดย่อยเฮกเซน > ส่วนสกัดย่อยน้ำ ผลการวิเคราะห์ปริมาณ

สารประกอบฟีนอลรวม พบว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของกระทือป่าและว่านริดสีดวงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงที่สุด ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.9822

พัชรี คล้ายวัฒนะ (2550) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของส่วนสกัดเอทานอลและส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเดทและน้ำของต้นขิงแม่โขง (*Zingiber mekongense* Gagnep.) โดยทดสอบความสามารถกำจัดอนุมูล DPPH ความสามารถกำจัดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์และความสามารถกำจัดอนุมูลไนตริกออกไซด์ เปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐานคือ บีเอชทีและกรดแอสคอร์บิก ผลการทดลองพบว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH และอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์สูงที่สุด อันดับสองรองลงมาคือส่วนสกัดย่อยเฮกเซน > ส่วนสกัดเอทานอล > ส่วนสกัดย่อยน้ำ ในขณะที่ส่วนสกัดย่อยน้ำแสดงฤทธิ์การกำจัดอนุมูลไนตริกออกไซด์สูงที่สุด ตามด้วยส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท > ส่วนสกัดแอทานอล > ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมพบว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบ ฟีนอลรวมสูงที่สุด ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.9849

Chan et al. (2007) ศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในใบของพืชสกุล *Etlingera* โดยใช้ใบสดสกัดด้วยเมทานอล วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันทำได้โดยดูความสามารถกำจัดอนุมูล DPPH ความสามารถในการรีดิวซ์ การคีเลทไอออนของโลหะ และเบต้า-คาโรทีนบลิชชิ่ง ทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย โดยวิธี disc-diffusion ผลการศึกษาพบว่าใบของดาหลาขาว (*Etlingera elatior*) และปุดใบลาย (*Etlingera rubrostriata*) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ความสามารถกำจัดอนุมูล DPPH และความสามารถในการรีดิวซ์ที่สูง ใบของปุดแดง (*Etlingera maingayi*) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ความสามารถการกำจัดอนุมูล DPPH และความสามารถในการรีดิวซ์ต่ำ แต่ความสามารถในการคีเลทไอออนโลหะและเบต้า-คาโรทีนบลิชมีค่าสูง ผลการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันในส่วนต่าง ๆ ของพืชดาหลาขาวพบว่าในส่วนของใบมีค่า > ดอก > ลำต้นใต้ดิน นอกจากนี้ยังพบว่าพืชที่อยู่ในพื้นที่ที่สูงจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH สูงกว่าพืชที่อยู่ในพื้นที่ที่ต่ำและใบของพืชสกุล *Etlingera* แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่ต้านแบคทีเรียแกรมลบ

Chan et al. (2008) ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ของพืชวงศ์ขิง 26 ชนิด โดยวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม และฤทธิ์

การกำจัดอนุมูล DPPH ของส่วนลำต้นใต้ดินพืชวงศ์ขิง 14 ชนิด เปรียบเทียบความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะ Fe^{2+} ในใบและลำต้นใต้ดินของพืช 8 ชนิด พบว่าใบของพืชสกุล *Etlingera* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH สูงที่สุด โดยที่ใบของดาหลาขาวและปุดแดงมีค่าสูงกว่ากว่าลำต้นใต้ดิน 7-8 เท่า ในขณะที่ในส่วนใบมีความสามารถในการคีเลท Fe^{2+} สูงกว่าลำต้นใต้ดินโดยเฉพาะใบของข่า (*Alpinia galanga*) สามารถคีเลท Fe^{2+} สูงกว่าลำต้นใต้ดินมากถึง 20 เท่านอกจากนี้ยังได้ศึกษาสมบัติการยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซิเนสจากใบของพืชสกุล *Etlingera* พบว่า ใบของดาหลาขาวแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด ตามด้วยใบของดาหลาหอม (*Etlingera fulgens)* และปุดแดง ซึ่งยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงกว่าตัวควบคุม

Marina et al. (2004) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และการยับยั้งแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยในพืชที่มีกลิ่น 10 ชนิด ที่สามารถต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ (Human Pathogenic Bacteria) ได้แก่พืช *Matricaria chamommilla, Mentha piperita, Mentha spicata, Lavandula angustifolia, Ocimum basilicum, Thymus vulgaris, Origanum vulgare, Salvia officinalis, Citrus limon* และ *Citrus aurantium* โดยตรวจพบว่ามีน้ำมันที่สามารถยับยั้ง ได้แก่ สาร Trymol, Linalyl acetate, Linalool, Limonene, alpha-Pinene, belta-Pinene,1,8-Cineole, Camphor, Carvacrol และ Menthol มีการต้านที่หลากหลายของแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ซึ่ง *Origanum vulgare* ให้ค่าสูงที่สุดและในส่วนของ Carvacrol มีการต้านเชื้อราได้สูงสุดของสารองค์ประกอบที่นำมาทดสอบ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. ขวดรูปก้นกลม ขนาด 500 -1000 mL
2. กรวยแก้ว ขนาด 1000 mL
3. กระดาษกรอง Whatman No. 1
4. หลอดทดลองขนาดเล็ก
5. ปิเปตอัตโนมัติ
6. อ่างควบคุมอุณหภูมิ บริษัท Grant, England
7. เครื่องบด (Blender)
8. เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง บริษัท Ohaus, Swizerland
9. เครื่องผสมแบบเขย่า (Vortex mixer) บริษัท Scientific Industries
10. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) บริษัท Radiometer, Denmark
11. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) บริษัท BUCHI, Switzerland
12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer) บริษัท Shimadzu
13. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี รุ่น Agilent 7890A

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. 2, 2-Diphenyl-1-picrylhdrazyl (DPPH) (Fluka, Germany)
2. Butylated hydroxyl toluene (BHT) (Aldrich, Germany)
3. Disodium hydrogen phosphate (Fisher Chemicals, England)
4. Dipotassium hydrogen phosphate (Carlo Erba, Germany)
5. Ethanol (commercial grade)
6. Methanol (J.T. Baker, Germany)
7. Dichloromethane (J.T. Baker, USA)
8. Folin-Cioculteau's reagent (Carlo Erba, Germany)
9. Gallic acid (Fluka, Germany)

10. Hexane (J.T. Baker, USA)

11. Iron (II) chloride (Fisher chemicals, England)

12. Iron (III) chloride (Fisher chemicals, England)

13. L-(+) ascorbic acid (Carlo Erba, Germany)

14. Potassium hydroxide pellet (BDH, England)

15. Potassium ferricyanide (Univar, Australia)

16. Sodium carbonate (Carlo Erba, Germany)

17. Sodium dihydrogen phosphate (Fisher Chemicals, England)

18. Trichloroacetic acid (Carlo Erba, Germany)

19. Folin-Ciocalteu reagent (BDH, England)

20. Dimethyl Sulfoxide (Fluka, Germany)

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้มีความบริสุทธิ์ระดับ Reagent Grade (ยกเว้น Ethanol – Commercial grade)

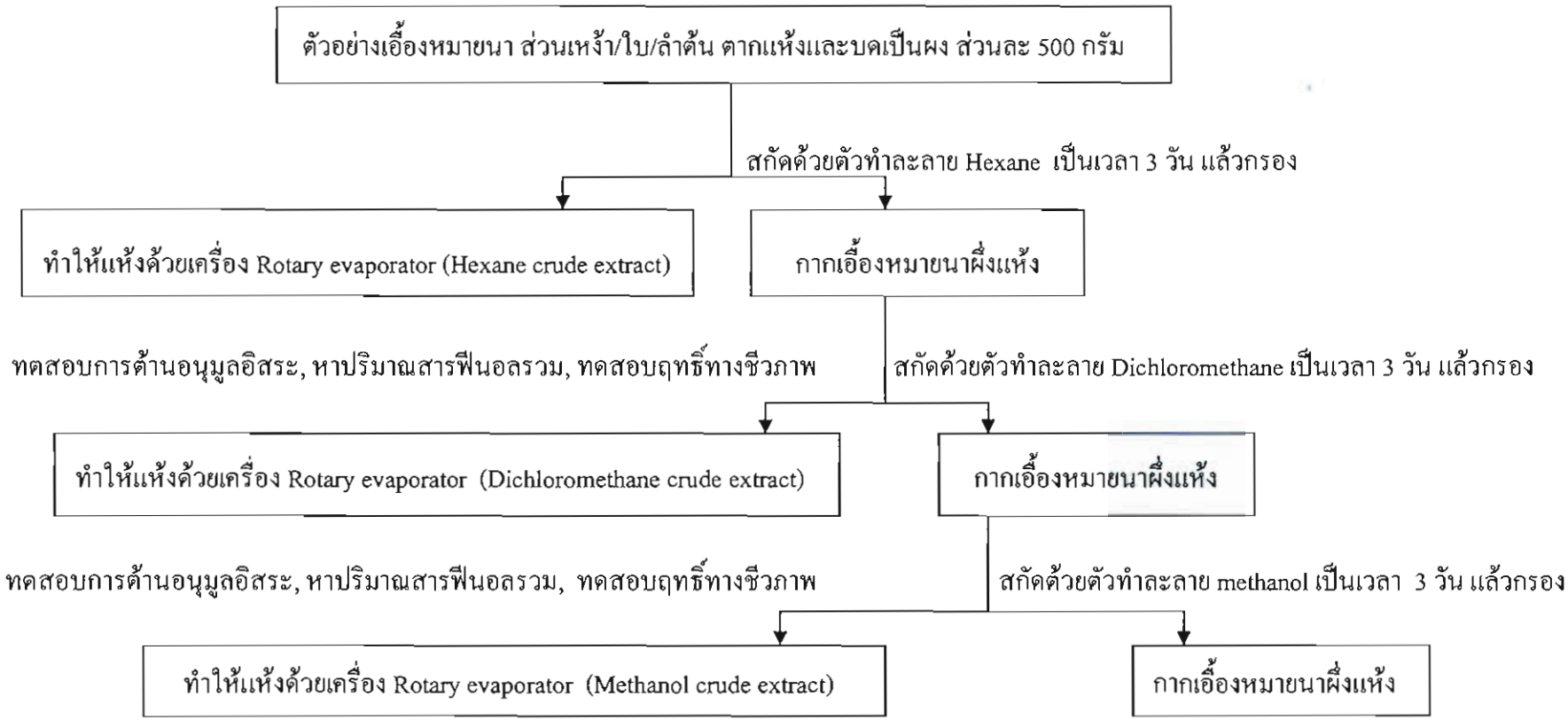
3.3 วิธีการวิจัย

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างส่วนเหง้า ใบ และต้นของเอื้องหมายนา

ตัวอย่างต้นเอื้องหมายนาสด เก็บจากบริเวณป่าพรุสิรินธร จังหวัดนราธิวาส ทำการแยกเป็นส่วน เหง้า ใบ และลำต้น ล้างแต่ละส่วนให้สะอาด แล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ผึ่งแดดให้แห้ง หลังจากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด

3.3.2 การสกัดสารตัวอย่าง

ชั่งน้ำหนักผงเอื้องหมายนาแห้ง ส่วนเหง้า ใบและลำต้น ส่วนละ 500 กรัม ห่อด้วยผ้าขาวบาง แยกใส่ลงในขวดโหล 3 ขวด แต่ละขวดเติมตัวทำละลายเฮกเซนพอท่วม ปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน เก็บสารละลายนำไปกรองด้วยกระดาษกรองแล้วทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator นำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณปริมาณส่วนสกัดที่ได้ หลังจากนั้นนำสมุนไพรส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซนมาผึ่งให้แห้ง และทำการสกัดด้วยวิธีเดียวกันแต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็นไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ตามลำดับ (ภาพที่ 3-1)



ภาพที่ 3-1 แผนผังแสดงขั้นตอนการสกัดตัวอย่างเอื้องหมายนาด้วยตัวทำละลาย

3.3.3 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดโดยวิธี DPPH assay (พัชรี คล้ายวัฒนะ, 2550)

เตรียมสารละลาย DPPH ในเมทานอลความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และตัวอย่างส่วนสกัดทุกส่วนที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 20, 50 100, 150 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตส่วนสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer โดยใช้กรดแอสคอบิก (Ascorbic acid) และ บีเอชที (BHT) เป็นตัวเทียบมาตรฐาน ทำการคำนวณร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (% Radical Scavenging)

$$\% \text{ Radical Scavenging} = (\text{A control} - \text{A sample})/\text{A control} \times 100$$

A control = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A sample = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

3.3.4 การคำนวณหาค่า IC_{50} (พัชรี คล้ายวัฒนะ, 2550)

IC_{50} คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูล $DPPH^{\cdot}$ ได้ 50 %

สามารถคำนวณได้โดยทำการพล็อตกราฟระหว่างร้อยละการต้านอนุมูล DPPH กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสาร แล้วหาสมการเส้นตรง (หรือลากกราฟที่ร้อยละการต้านเท่ากับ 50 ก็จะได้ความเข้มข้น) แทนค่า y ด้วย 50 จะได้ค่า x คือ ค่าความสามารถของปริมาณสารที่ทำการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง ถ้าค่าน้อยแสดงว่ามีการต้านอนุมูลอิสระมาก

3.3.5 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay (Chu et al., 2000)

เตรียมสารละลาย FRAP (ferric reducing /antioxidant power) โดยเติมสารละลาย acetate buffer ค่าพีเอช 3.6, 10 มิลลิโมล TPTZ (2,4,6–tripyridly-s-triazine) โดยเตรียมในสารละลาย 40 มิลลิโมลของกรด HCl และ 20 มิลลิโมลของ ferric chloride ในอัตราส่วน 10 : 1 : 1 (V/V) ตามลำดับ จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เติม 3 มิลลิลิตร ของสารละลาย FRAP นำไปบ่มที่อุณภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 60 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer โดยใช้ FRAP reagent เป็นสารควบคุม นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างจากสารละลาย iron (II) sulfate ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยรายงานผลเป็น FRAP value (ไมโครกรัม Fe^{2+} ต่อมิลลิลิตรของสารสกัด)

3.3.6 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (กันญารัตน์ ภิรมย์มั่น, 2550)

สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ละลายเมทานอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย gallic acid หรือส่วนสกัดที่ละลายในเมทานอลปริมาตร 0.125 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ด้วย Vortex mixer แล้วเติมสารละลาย Folin-Cioculteau 's reagent ปริมาตร 0.125 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติม 7 % ของ sodium carbonate ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer โดยใช้เมทานอลเป็น Blank แสดงปริมาณสารฟีนอลรวมเฉลี่ยในรูปมิลลิกรัมของกรดแกลลิก (GAE) ต่อส่วนสกัด 1 กรัม

3.3.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในส่วนสกัดหยาบเมทานอลของเหง้าเอื้องหมายนา ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมทรี (ดวงฤดี หวั้นหนู และคณะ, 2553)

ทำการวิเคราะห์ส่วนสกัดหยาบเมทานอลของเหง้าเอื้องหมายนา ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมเตอร์ รุ่น Agilent 7890A Gas Chromatography with Mass Selective Detector รุ่น 5975C สภาวะของเครื่องมือที่ใช้มีดังต่อไปนี้

Column : DB-5MS (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane close to USP Phase G27, 25 m × 250 μm ID, 0.25 μm, J&W 122 - 5532

Carrier gas: Helium

Oven : 40 °C for 2 min, then 10 °C/min to 280 °C

Injection : Split, Split Ratio 100:1, Split flow 75 ml/min, 280 °C

Detector : MSD, 280 °C transfer line full scan at m/z 30-650

MS Source : 230 °C maximum 250 °C

MS Quad : 150 °C maximum 200 °C

3.3.8 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

1. การเตรียมสารสกัด โดยนำสารสกัดหยาบที่ได้ 0.1 กรัม มาทำเป็นสารละลายอีกครั้งด้วย Dimethyl sulfoxide (Riedel-de Haen, Germany) 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปกรองเพื่อให้ปราศจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วยเมมเบรน 0.45 ไมครอน ชนิด PTFE (Sartorious, Germany)

2. การเตรียมจุลินทรีย์สำหรับทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญโดยวิธี agar disc diffusion

แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus*

แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa*

ยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans*

แบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบเลี้ยงในอาหาร Tryptic soy broth (Oxoid, England) หรือ Tryptic soy agar (Oxoid, England) ที่ 37 องศาเซลเซียส ส่วนยีสต์เลี้ยงในอาหาร Sabouraud dextrose agar (Difco TM, USA) หรือ Sabouraud dextrose broth (Difco TM, USA) ที่อุณภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จุลินทรีย์สำหรับทดสอบได้จากการเตรียมจุลินทรีย์แขวนลอย (microbial suspension) จากจุลินทรีย์ที่กำลังเจริญอยู่ใน log phase ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ MacFarland standard No. 0.5 หลังจากนั้นใช้ไม้พันสำลี (swab) ปลอดเชื้อป้ายแบคทีเรียแขวนลอยลงบนจานอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar (Oxoid, England) ส่วนยีสต์แขวนลอยของ *Candida albican* ให้ป้ายลงบนอาหาร Sabouraud dextrose agar

3. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี agar disc diffusion หยดสารสกัดที่ผ่านการกรองเพื่อให้ปลอดเชื้อ 10 ไมโครลิตรลงบนแผ่นกระดาษกรองวงกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่วางอยู่บนจานอาหารแข็งที่ป้ายจุลินทรีย์แขวนลอยไว้เรียบร้อยแล้ว หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียและ 30 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมงสำหรับยีสต์

ใช้ Ceftazidime (CAZ) 30 µg/ disc เป็น positive control สำหรับ *P. aeruginosa*

ใช้ Gentamicin 10 µg/ disc เป็น positive control สำหรับ *E. coli*

ใช้ Ampicillin 10 µg/ disc เป็น positive control สำหรับ *S. aureus*

ใช้ Flukonazole 25 µg/ disc เป็น positive control สำหรับ *C. albican*

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 สารสกัดหยาบจากส่วนเหง้า ใบและต้นเอื้องหมายนา

จากการนำเอื้องหมายนาในส่วน เหง้า ใบและต้น มาทำการสกัดด้วยวิธีมาเซอเรชันด้วยตัวทำละลายทั้งหมด 3 ชนิด คือ ตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอลแล้วนำไปทำการระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 9 ชนิด มีลักษณะเป็นของแข็งสีดำ โดยผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4-1 จากตารางพบว่าในตัวทำละลาย เมทานอลให้ปริมาณสารสกัดสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ โดยสารสกัดหยาบเมทานอลจากเหง้าเอื้องหมายนามีปริมาณผลที่ได้ (yield) เท่ากับ 22.12 กรัม หรือร้อยละ 7.47 ของน้ำหนักแห้ง จากส่วนใบมีปริมาณผลที่ได้ (yield) เท่ากับ 31.14 กรัม หรือร้อยละ 10.38 ของน้ำหนักแห้ง และจากส่วนต้นปริมาณผลที่ได้ (yield) เท่ากับ 35.36 กรัม หรือร้อยละ 11.79 ของน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนจากส่วนต่าง ๆ ของพืชให้ปริมาณที่ผลได้ (yield) น้อยที่สุด คือ ร้อยละ 0.48, 0.71 และ 1.43 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวทำละลายเมทานอลมีความมีขั้วสูง สามารถละลายสารประกอบต่าง ๆ ที่มีขั้วและมีขั้วต่ำในตัวอย่างพืชได้ดี ในขณะที่ตัวทำละลายไม่มีขั้ว (เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน) จะละลายเฉพาะสารอินทรีย์มีไม่มีขั้วออกมาเท่านั้น

ตารางที่ 4-1 ปริมาณที่สกัดได้ (Yield) ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหง้า ใบ และต้นเอื้องหมายนา ในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล

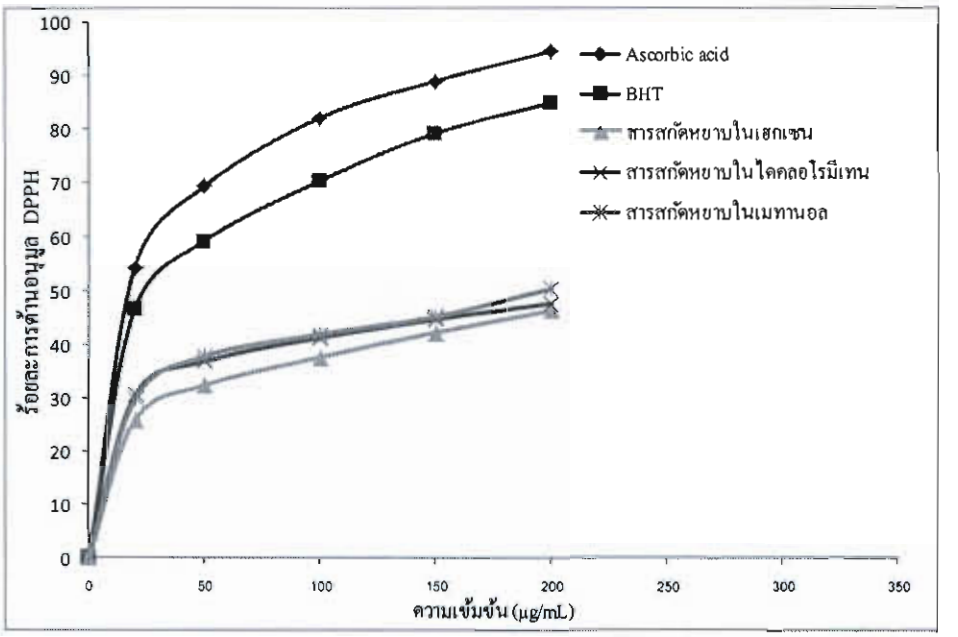
ตัวอย่างพืช	น้ำหนักส่วนสกัดหยาบ (กรัม)			ร้อยละส่วนสกัดหยาบ		
	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เมทานอล	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เมทานอล
เหง้า	1.42	8.22	22.12	0.48	2.74	7.47
ใบ	2.13	10.42	31.14	0.71	3.47	10.38
ต้น	4.29	15.25	35.36	1.43	5.08	11.79

4.2 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

4.2.1 ทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหง้า ใบและต้นเอื้องหมายนา

เมื่อนำสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล จากส่วนเหง้า ใบ และต้นเอื้องหมายนา มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH โดยนำมาเตรียมเป็นสารละลายที่ช่วงความเข้มข้น 20-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4-2, 4-3 และ 4-4 จากการทดสอบพบว่าทุกสารสกัดหยาบมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ใกล้เคียงกันและมีความสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันคือ ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพิ่มขึ้น โดยสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล จากส่วนเหง้ามีค่าร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH อยู่ในช่วง 25.98-46.57, 30.56-47.55 และ 29.74-50.33 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-2) สารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล จากส่วนใบมีค่าร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH อยู่ในช่วง 25.82-47.22, 25.00-45.42 และ 27.29-45.10 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-3) และส่วนด้น สารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล มีค่าร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH อยู่ในช่วง 24.35-43.63, 28.76-47.88 และ 29.25-48.04 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-4)

เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 2 ชนิด ที่ช่วงความเข้มข้นเดียวกัน (20-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของเอื้องหมายนามีค่าร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ต่ำกว่าของสารมาตรฐาน Ascorbic acid และ BHT ซึ่งมีค่าร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH อยู่ในช่วง 54.41-94.62 และ 46.57-84.97 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-5) และเมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล จะมีค่าร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ประมาณครึ่งหนึ่งของสารมาตรฐาน Ascobic และ BHT เท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในสารสกัดหยาบมีสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่หลายชนิด แต่มีองค์ประกอบบางชนิดเท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยความสามารถในการด้านอนุมูล DPPH ของสารจะรายงานในรูปของค่า IC_{50}

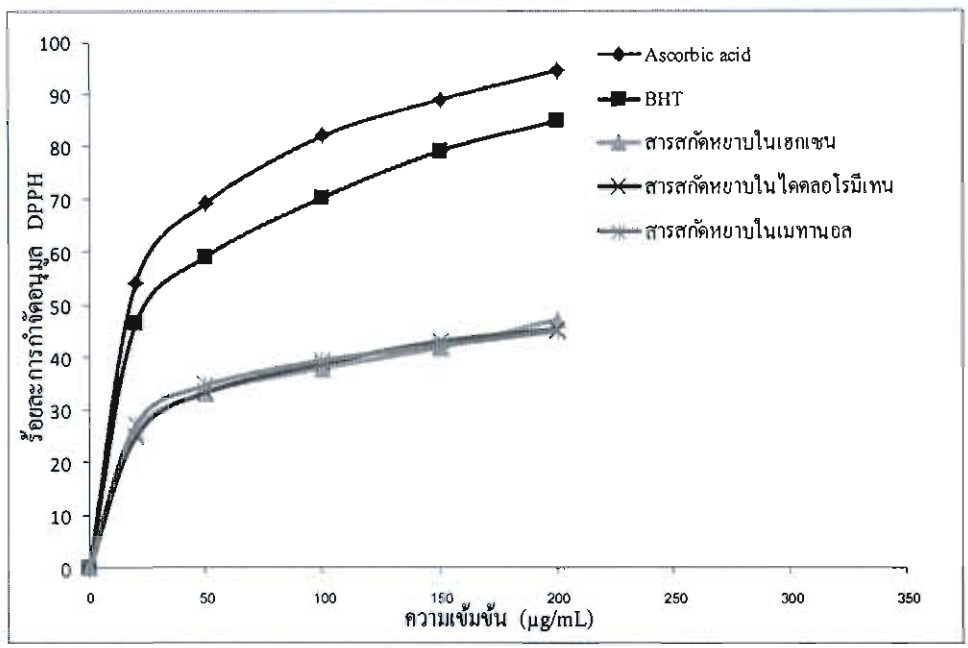


ภาพที่ 4-1 ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล จากส่วนเหง้าเอื้องหมายนา ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 4-2 ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล จากส่วนเหง้าเอื้องหมายนา ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบ		
	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เมทานอล
20	25.98 ± 0.75	30.55 ± 0.74	29.74 ± 0.56
50	32.35 ± 0.49	36.76 ± 0.49	37.74 ± 0.98
100	37.58 ± 0.74	41.17 ± 0.49	41.83 ± 0.28
150	42.16 ± 0.40	44.61 ± 0.40	45.09 ± 0.49
200	46.57 ± 0.28	47.55 ± 0.75	50.33 ± 0.74

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งเป็นอิสระต่อกัน แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

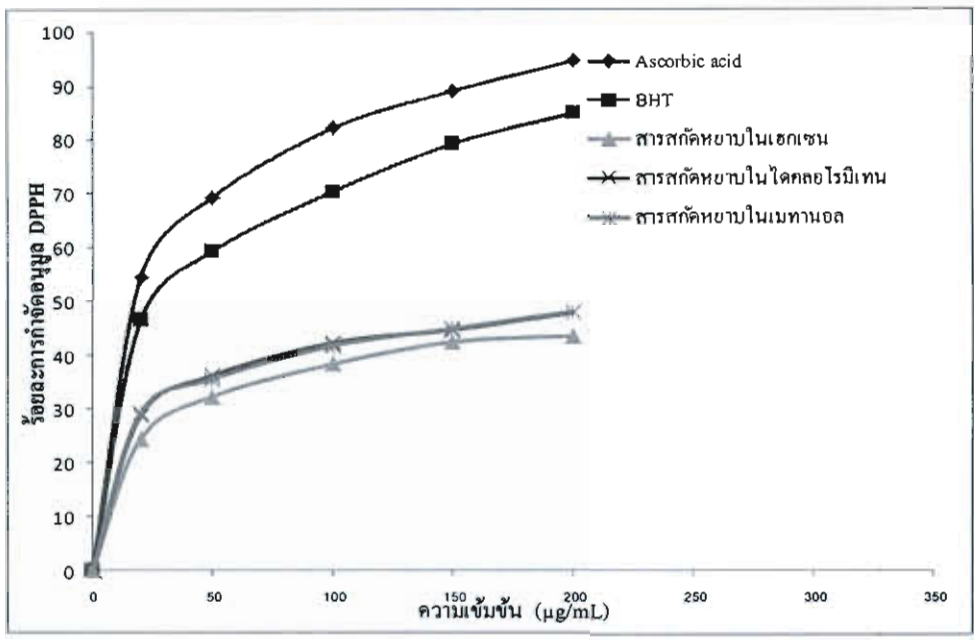


ภาพที่ 4-2 ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล จากส่วนเหง้าเอื้องหมายนา ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 4-3 ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล จากส่วนใบเอื้องหมายนา ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ	ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบ		
(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เมทานอล
20	25.82 ± 1.02	25.00 ± 1.29	27.29 ± 0.74
50	33.33 ± 0.98	33.49 ± 1.02	34.80 ± 0.49
100	38.07 ± 0.57	38.89 ± 1.23	39.54 ± 0.75
150	41.99 ± 0.57	43.14 ± 0.85	42.32 ± 0.57
200	47.22 ± 1.23	45.42 ± 1.13	45.10 ± 0.49

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งเป็นอิสระต่อกัน แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

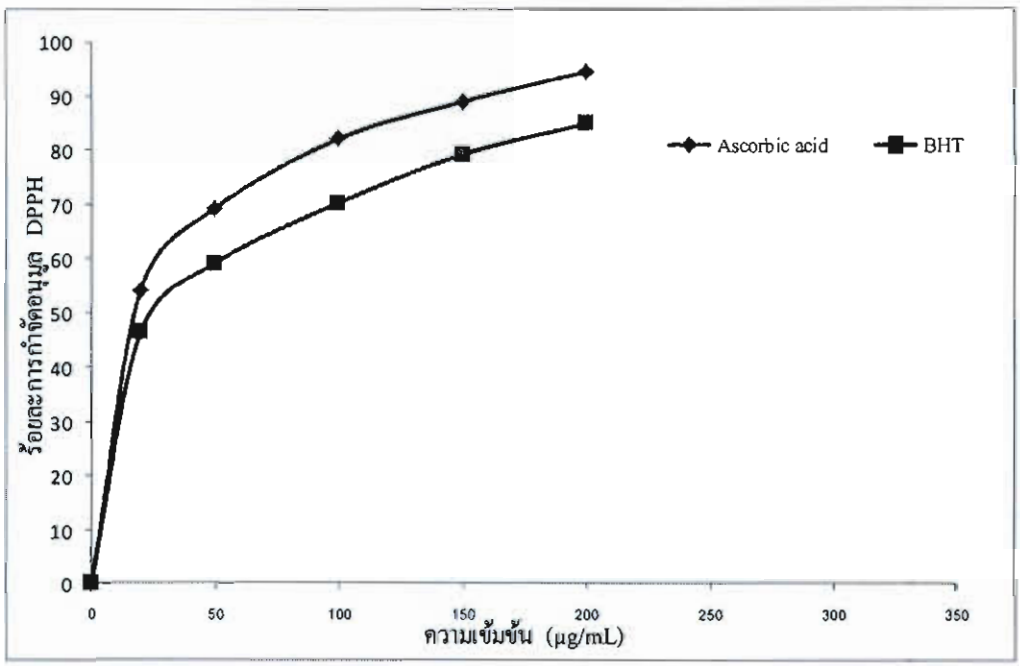


ภาพที่ 4-3 ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล จากส่วนเหง้าเอื้องหมายนา ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 4-4 ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล จากส่วนต้นเอื้องหมายนา ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ	ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบ		
(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เมทานอล
20	24.35 ± 1.23	28.76 ± 0.23	29.25 ± 0.56
50	32.35 ± 0.49	36.27 ± 0.49	35.62 ± 0.74
100	38.40 ± 0.74	42.3 ± 0.56	41.83 ± 0.28
150	42.48 ± 0.74	44.77 ± 0.28	44.93 ± 0.74
200	43.63 ± 0.41	47.88 ± 0.28	48.04 ± 0.49

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งเป็นอิสระต่อกัน แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ



ภาพที่ 4-4 ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของ Ascorbic acid และ BHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 4-5 ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของ Ascorbic acid และ BHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสาร	ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH	
(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	Ascorbic acid	BHT
20	54.41 ± 0.98	46.57 ± 0.49
50	69.44 ± 0.75	59.31 ± 0.98
100	82.19 ± 0.57	70.42 ± 0.75
150	89.054 ± 1.23	79.25 ± 0.75
200	94.62 ± 0.85	84.97 ± 1.42

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งเป็นอิสระต่อกัน แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

ค่าความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH ของสารจะแสดงในรูปของค่า IC_{50} ซึ่งคือค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถดักจับอนุมูล DPPH ได้ร้อยละ 50 หากค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบตัวใดมีค่าสูง แสดงว่ามีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำ หากค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบตัวใดต่ำแสดงว่ามีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง โดยค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหง้า ใบ และต้นของเอื้องหมายนา และสารมาตรฐาน Ascorbic acid และ BHT แสดงในตารางที่ 4-6 (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ค)

ตารางที่ 4-6 ค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอลจากส่วนเหง้า ใบและต้นเอื้องหมายนา และสารมาตรฐาน Ascorbic acid และ BHT

สารสกัดหยาบ		ค่า IC_{50} ของการกำจัดอนุมูล DPPH (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
เหง้า	เฮกเซน	336.97
	ไดคลอโรมีเทน	232.76
	เมทานอล	204.38
ใบ	เฮกเซน	340.36
	ไดคลอโรมีเทน	333.62
	เมทานอล	320.54
ต้น	เฮกเซน	395.44
	ไดคลอโรมีเทน	232.76
	เมทานอล	235.09
Ascorbic acid		16.09
BHT		23.67

จากตารางพบว่า สารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอลจากส่วนเหง้ามีค่า IC_{50} (336.97, 232.76 และ 204.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ต่ำกว่าสารสกัดหยาบจากส่วนใบและต้น แสดงว่าสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอลจากส่วนเหง้ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าส่วนอื่นๆ นอกจากการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ยังทดสอบด้วยวิธี FRAP assay ซึ่งแสดงผลดังต่อไปนี้

4.2.2 ผลการทดสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากส่วนเหง้า ใบ และต้นเอื้องหมายนา โดยวิธี FRAP

เมื่อนำสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล จากส่วนเหง้า ใบ และต้นเอื้องหมายนา มาทดสอบความสามารถในการรีดิวส์ Fe^{3+} ให้เป็น Fe^{2+} โดยเมื่อทำการทดสอบแล้วสารสกัดตัวใดตรวจพบ Fe^{2+} ในปริมาณที่สูงจะมีความสามารถในการรีดิวส์สูงเช่นกัน โดยเตรียมสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน $FeSO_4$ ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 4-7 ซึ่งจากการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลจากส่วนเหง้า ใบ และต้นมีค่า FRAP (162.60, 135.08 และ 154.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ที่สูงกว่าสารสกัดหยาบเฮกเซน (122.27, 106.91 และ 125.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) และสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากเหง้าและใบ (145.32 และ 131.87 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) เป็นที่น่าสังเกตว่าส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากต้นมีค่า FRAP สูงที่สุด (172.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบเหล่านี้มีค่า FRAP ต่ำกว่ากรณีของสารละลายมาตรฐาน (214.46 ± 1.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

การทดสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay นี้เป็นการทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบในการรีดิวส์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ผลที่ได้จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันปานกลาง

ตารางที่ 4-7 ความสามารถในการรีดิวส์ Fe^{3+} ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหง้า ใบและต้นเอื้องหมายนา ที่มีความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

	FRAP value (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (X ± SD)		
ตัวอย่างพืช	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เมทานอล
เหง้า	122.27 ± 1.11	145.32 ± 2.22	162.60 ± 2.93
ใบ	106.91 ± 2.93	131.87 ± 1.11	135.08 ± 1.11
ต้น	125.47 ± 1.11	172.20 ± 1.11	154.92 ±1.11
Iron(II) sulphate	214.46 ± 1.11		

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งเป็นอิสระต่อกัน แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

จากการวิจัย เมื่อนำสารสกัดหยาบทั้ง 9 ชนิด มาทำการทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลไฮโดรเจนที่คงตัว มีสีม่วงในสารละลาย และเมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระให้หรือรับอิเล็กตรอนแก่อนุมูล DPPH จะได้เป็นสาร diphenyl picrylhydrazyl (DPPH:H) มีสีเหลืองนวลไม่เป็นอนุมูลอิสระอีกต่อไป (โอภา วัชรคุปต์ และคณะ, 2550) การกำจัดอนุมูล DPPH จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ การกำจัดอนุมูล DPPH เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณสารสกัดมีค่าสูงขึ้น โดยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จะรายงานผลในรูป IC_{50} ซึ่งถ้าสารสกัดหยาบชนิดใดมีค่า IC_{50} ต่ำจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง ถ้าสารใดมีค่า IC_{50} สูงจะมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำ จากการวิจัยเมื่อพิจารณาจากค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ พบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนเหง้ามีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงกว่าสารสกัดหยาบจากส่วนอื่น ๆ และประสิทธิภาพการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชนิดต่าง ๆ มีค่าเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ สารสกัดหยาบเมทานอล > สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน > สารสกัดหยาบเฮกเซน นั่นคือตัวทำละลายเมทานอลสามารถละลายสารที่ออกฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ได้มากที่สุด อย่างไรก็ตาม สารสกัดหยาบทุกชนิดของเอื้องหมายนามีฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH ที่ต่ำกว่าสารมาตรฐาน Ascorbic acid และ BHT ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.09 และ 23.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การทดสอบความสามารถในการรีดิวส์ ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งในการต้านออกซิเดชัน เป็นการทดสอบความสามารถในการรีดิวส์ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} โดยในสารใดมีค่าความเข้มข้นของ Fe^{2+} สูงจะมีความสารถในการรีดิวส์สูงซึ่งจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการรีดิวส์ของสารสกัดจากเหง้า ใบ และต้นเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลจากส่วนเหง้า ใบ และต้นมีค่า FRAP ที่สูงกว่าสารสกัดหยาบเฮกเซน แต่สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากต้นเอื้องหมายนา มีความสามารถในการรีดิวส์สูงที่สุด อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบทุกชนิดมีความสามารถในการรีดิวส์ต่ำกว่าสารมาตรฐาน $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ซึ่งมีค่าความเข้มข้นของ Fe^{2+} เท่ากับ 214.46 ± 1.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay พบว่าผลที่ได้มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH สารสกัดหยาบเมทานอล > สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน > สารสกัดหยาบเฮกเซน ส่วนความสามารถในการรีดิวส์ Fe^{3+} ให้เป็น Fe^{2+} มีค่าสูงสุดในสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากส่วนต้นและมีค่าใกล้เคียงกับสารสกัดหยาบจากเมทานอล ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกัน ดังแสดงในตารางที่ 4-8

ตารางที่ 4-8 ตารางแสดงการเปรียบเทียบปริมาณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay และ FRAP assay

ตัวอย่าง	สารสกัด	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH		FRAP (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
			ร้อยละ	ค่า IC_{50}	
เหง้า	เฮกเซน	200	46.24 ± 0.28	362.4	122.27 ± 1.11
	ไดคลอโรมีเทน	200	47.55 ± 0.49	233.08	145.32 ± 2.22
	เมทานอล	200	50.33 ± 0.75	205.37	162.60 ± 2.93
ใบ	เฮกเซน	200	43.63 ± 0.49	336.99	125.47 ± 1.11
	ไดคลอโรมีเทน	200	47.88 ± 0.28	340.9	131.87 ± 1.11
	เมทานอล	200	48.04 ± 0.49	320	154.92 ± 1.11
ต้น	เฮกเซน	200	47.22 ± 1.23	396.91	106.91 ± 2.93
	ไดคลอโรมีเทน	200	45.42 ± 1.13	232.11	172.20 ± 1.11
	เมทานอล	200	45.09 ± 0.49	234.74	135.08 ± 1.11
Ascorbic acid		200	94.61 ± 0.85	16.25	-
Iron(II) sulphate		200	-	-	214.46 ±1.11

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระทั้งสองวิธีมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือสารสกัดหยาบเมทานอลในเหง้าเอื้องหมายนามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าในสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนและเฮกเซนจากส่วนใบและต้น และเมื่อสารสกัดหยาบมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้นและความสามารถในการรีดิวส์เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Vijayalakshmi an Sarada (2007) ที่พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลจากเหง้าเอื้องหมายนามีฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH สูงที่สุดเมื่อเทียบกับส่วนใบและเปลือกในตัวทำละลายเมทานอล และส่วนใบ เปลือกและเหง้าในตัวทำละลายเมทิลไตรคลอไรด์ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการวิจัยของ Jha et al. (2010) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเหง้าเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเมทานอล โดยทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH, ไนตริกออกไซด์, สารฟลาโวนอยด์ โดยใช้กรดแอสคอบิกและสารควอซีตินเป็นสารมาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเหง้าเอื้องหมายนามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้จากผลการทดลองพบว่าความทนทานต่อพิษของกุ้งมีค่า LC_{50} เท่ากับ 31.55 มิลกรัมต่อมิลลิลิตร และนอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen et al. (2008) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของ

พืชตระกูลขิงที่พบในประเทศไต้หวัน โดยทำการศึกษาเหง้าของพืชตระกูลขิงทั้งหมด 18 ชนิด 5 วงศ์ คือวงศ์ *Alpinia* 9 ชนิด วงศ์ *Costus speciosus* (Koenig) Smith 1 ชนิด วงศ์ *Curcuma* 4 ชนิด วงศ์ Hedychium 1 ชนิด วงศ์ *Vanoverberghia sasakiana* 1 ชนิด และวงศ์ *Zingiber* 2 ชนิด นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล แล้วนำไปหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยวิธี Folin-Ciocalteau method ทดสอบความสามารถในการกำจัด 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) ทดสอบ reducing power และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่า พืชในวงศ์ *Alpinia* และ genus *Curcumas* มีปริมาณฟีนอลิกรวมเฉลี่ย 17.01 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 30.02 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และพบค่าสูงที่สุดใน *Vanoverberghia sasakiana* คือ 36.50 มิลลิกรัมต่อกรัม ปริมาณสารต้านออกซิเดชันมีฤทธิ์ต้านที่ดี (89 เปอร์เซนต์) ในวงศ์ *Vanoverberghia* และ *Hedychium* ส่วนฤทธิ์ต้าน DPPH มีค่าใกล้เคียงกัน โดยในวงศ์ *Zingiber oligophyllum* พบในปริมาณต่ำที่สุด นอกจากนี้พืชที่ทดสอบส่วนใหญ่ต้านแบคทีเรียได้ แต่วงศ์ *Hedychium* และวงศ์ *Vanoverberghia* ไม่สามารถต้านเชื้อ *Escherichia coli* และ *Vibrio parahaemolyticus*

จากการวิจัยแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบทุกชนิดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง ดังนั้นจึงนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทำการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม โดยได้ผลดังหัวข้อที่ 4.3

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดจากส่วนเหง้า ใบและต้นเอื้องหมายนา

เมื่อนำสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล จากส่วนเหง้า ใบ และต้นเอื้องหมายนามาทดสอบเพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม พบว่าสารประกอบฟีนอลรวมในสารสกัดหยาบเมทานอลของส่วนเหง้า มีปริมาณสูงที่สุด และสูงกว่าสารสกัดหยาบชนิดอื่น ๆ โดยมีปริมาณในส่วนเหง้า ใบ และต้นเอื้องหมายนาคือ 36.25, 29.44 และ 34.89 มิลลิกรัมของกรดแกลลิก (GAE) ต่อส่วนสกัด 1 กรัมตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดหยาบเฮกเซนตรวจพบสารประกอบฟีนอลรวมต่ำสุด คือ 20.99, 25.12 และ 21.25 มิลลิกรัมของกรดแกลลิก (GAE) ต่อส่วนสกัด 1 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4-9)

ตารางที่ 4-9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอลจากส่วนเหง้า ใบ และต้นเอื้องหมายนา

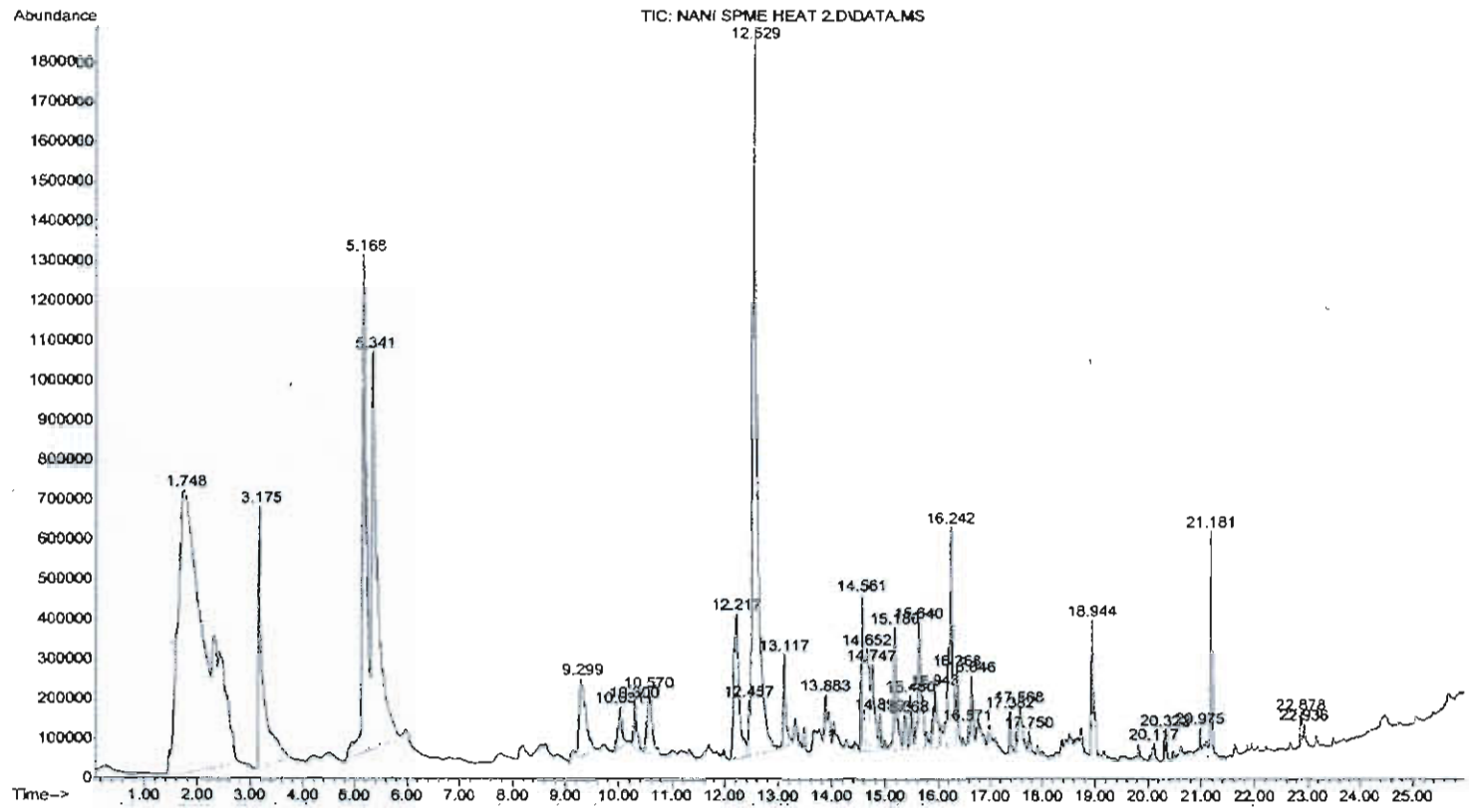
ตัวอย่างพืช	ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (มิลลิกรัมของกรดแกลลิก (GAE) ต่อส่วนสกัด 1 กรัม)		
	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เมทานอล
เหง้า	20.99 ± 0.11	25.45 ± 0.04	36.25 ± 0.04
ใบ	25.12 ± 0.02	25.09 ± 2.12	29.44 ± 0.08
ต้น	21.25 ± 0.19	30.77 ± 0.10	34.89 ± 0.02

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งเป็นอิสระต่อกัน แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

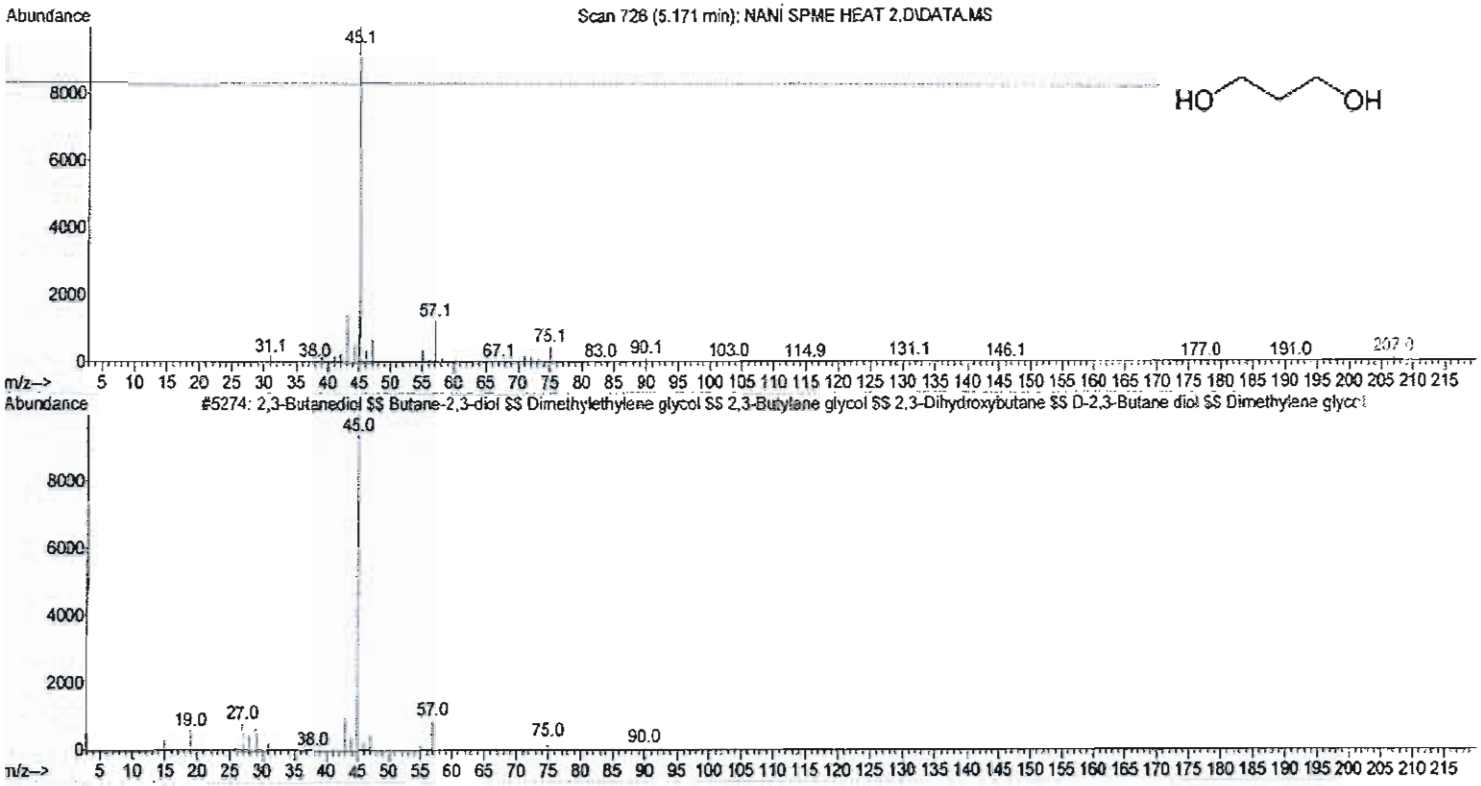
จากการวิจัย สารประกอบฟีนอลรวมในสารสกัดหยาบเมทานอลของส่วนเหง้า มีปริมาณสูงที่สุด และสูงกว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนจากส่วนใบและต้นซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vijayalakshmi and Sarada (2008) ที่ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบเปลือกลำต้น และรากเอื้องหมายนา ในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอลและไดคลอโรมีเทน โดยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน และด้วยวิธี ABTS โดยใช้แกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิล และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ผลการทดลองพบว่า สารประกอบปริมาณฟีนอลรวมและร้อยละการต้านอนุมูลไฮดรอกซิลในส่วนสกัดเมทานอลจากรากและเปลือกลำต้น มีปริมาณสูงเมื่อเทียบกับส่วนใบ นอกจากนี้ยังได้นำสารสกัดหยาบเมทานอลจากเหง้าเอื้องหมายนาไปวิเคราะห์ด้วยวิธี GC/MS เพื่อหาองค์ประกอบทางเคมีต่อไป

4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมทานอลจากส่วนเหง้าเอื้องหมายนาด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมทรี (GC/MS)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและพบว่าในสารสกัดหยาบเมทานอลจากเหง้ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงที่สุด จึงได้นำสารสกัดหยาบมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/MS เพื่อหาองค์ประกอบทางเคมี โดยตัวอย่างโครมาโทแกรมแสดงดังภาพที่ 4-5, 4-6, 4-7 และ 4-8 และองค์ประกอบทางเคมี แสดงในตารางที่ 4-10



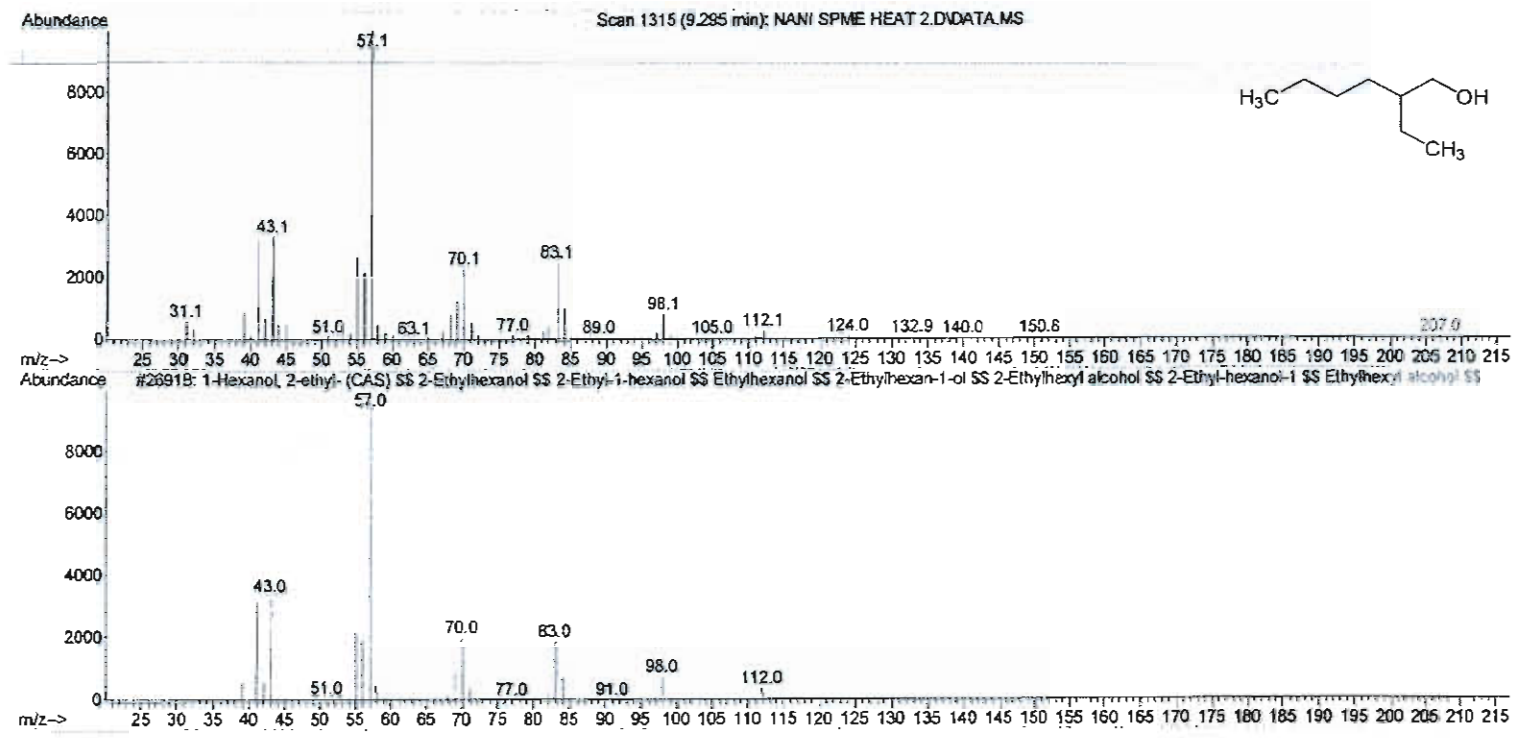
ภาพที่ 4-5 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารสกัดเมทานอลจากเหง้าเอื้องหมายนาจากการวิเคราะห์ด้วย GC/MS



ภาพที่ 4-6 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารสกัดเมทานอลจากเหง้าเอื้องหมายนาที่ได้จาก GC/MS เทียบกับ Library

Searched : wiley7N edition, Retention Time 5.17 minute, Quality : 86 %,

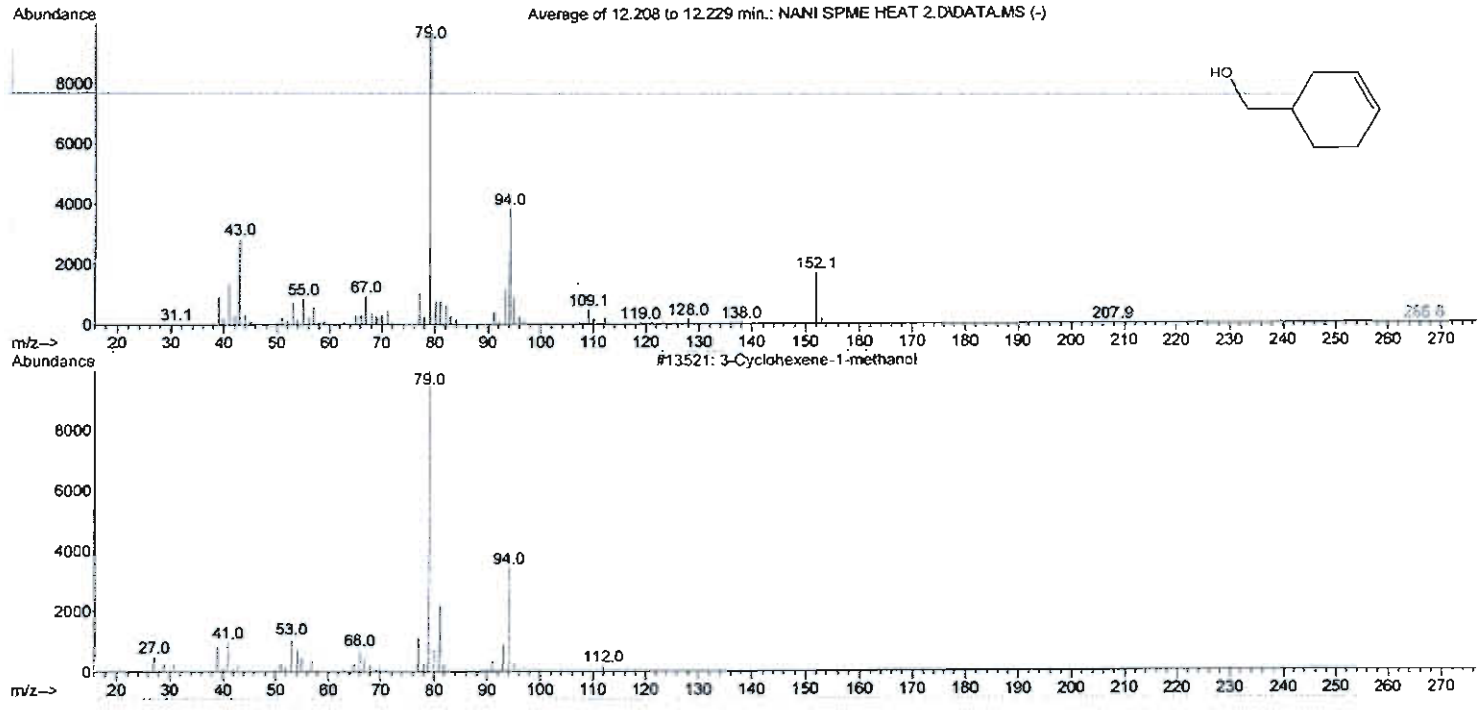
Total : 8.45 %, ID : **2,3-butanediol**



ภาพที่ 4-7 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารสกัดเมทานอลจากเหง้าเอื้องหมายนาที่ได้จาก GC/MS เทียบกับ Library

Searched : wiley7N edition, Retention Time 9.29 minute, Quality : 90 %,

Total : 2.05 %, ID : **2-ethylhexanol**

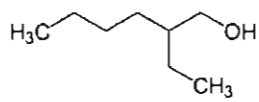
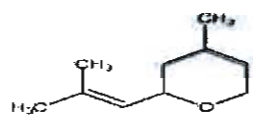
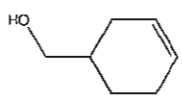


ภาพที่ 4-8 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารสกัดเมทานอลจากเหง้าเอื้องหมายนาที่ได้จาก GC/MS เทียบกับ Library

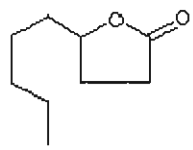
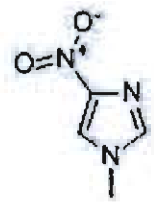
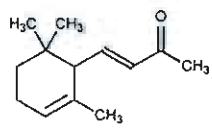
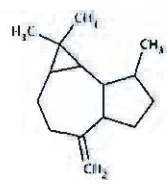
Searched : wiley7N edition, Retention Time 12.22 minute, Quality : 83 %,

Total : 3.21 %, ID : **3-cyclohexene-1-methanol**

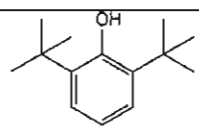
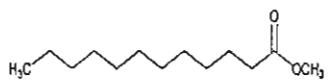
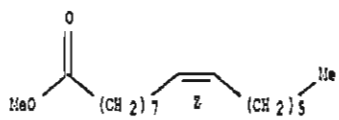
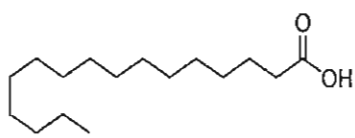
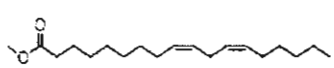
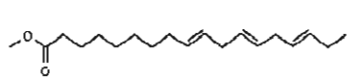
ตารางที่ 4-10 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมทานอลจากเหง้าเอื้องหมายนาจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/MS

Retention Time (minute)	% of total	% Quality	Library Name (Wiley7N edition)	Activity	สูตรโครงสร้างทางเคมี
5.17	8.45	86	1,3-Butanediol	-	
9.29	2.05	90	2-Ethylhexanol	-	
10.03	0.62	53	4-Methyl-2-(2-methyl-1-propenyl tetrahydropyran	-	
12.22	3.21	83	3-Cyclohexene-1-methanol	-	
13.12	1.00	64	Nonanal dimethyl acetal	-	
14.56	1.91	43	decylaldehyde dimethylacetal	-	

ตารางที่ 4-10 (ต่อ)

Retention Time (minute)	% of total	% Quality	Library Name (Wiley7N edition)	Activity	สูตรโครงสร้างทางเคมี
14.65	1.45	72	delta-n-Amylbutyrolactane	-	
14.75	1.41	35	gamma-octalactone	-	
15.18	1.61	64	1-Methyl-4-nitromidazole	-	
15.37	0.37	95	alpha-Ionone	-	
15.64	1.94	64	Geranylacetone	-	
15.94	0.97	91	Alloaromadendrene	-	

ตารางที่ 4-10 (ต่อ)

Retention Time (minute)	% of total	% Quality	Library Name (Wiley7N edition)	Activity	สูตรโครงสร้างทางเคมี
16.37	0.61	93	4-Methyl-2,6-di-tert-butylphenol	Antioxidant**	
16.57	0.13	98	Methyl laurate	Antioxidant*	
20.97	0.13	95	Methyl palmitoleinate	Antioxidant*	
21.18	1.66	53	Palmitic acid	Antioxidant*	
22.88	1.17	99	Methyl linoleate	Antioxidant*	
22.94	0.10	99	Methyl 9,12,15, octadecatrienoate	Antioxidant*	

หมายเหตุ Chu et al. (2000)

จากการวิเคราะห์พบว่ามีสารองค์ประกอบ 18 ชนิด สาร 5 องค์ประกอบแรกที่มีปริมาณสูงสุด ได้แก่ 2,3-butanediol (8.45 เปอร์เซนต์), 3-cyclohexane-1-methanol (3.21 เปอร์เซนต์), 2-ethylhexanol (2.05 เปอร์เซนต์), geranylvacetone (1.94 เปอร์เซนต์) และ decylaldehyde dimethylacetal (1.91 เปอร์เซนต์) ยังตรวจพบสารประกอบฟีนอลที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ 4-methyl-2,6-di-tert-butylphenol (0.61 เปอร์เซนต์) และกรดไขมัน palmitic acid (C16, 1.66 เปอร์เซนต์) และ เอสเทอร์ของกรดไขมัน 4 ชนิดในปริมาณเล็กน้อย (ตารางที่ 4-9)

สารประกอบฟีนอล 4-methyl-2,6-di-tert-butylphenol ที่พบมีเพียงปริมาณ 0.61 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณน้อย ดังนั้นการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอื้องหมายนาจึงอาจมาจากสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่น คือ กรดไขมัน palmitic acid และ เอสเทอร์ของกรดไขมันทั้ง 4 ชนิด ในการหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเอื้องหมายนาในครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Anonymous (2007) ได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันจากเมล็ดเอื้องหมายนา โดยสมบัติของน้ำมันที่ได้มีดังนี้

Specific gravity	0.9125	Refractive index	1.4672
Acid value	23.84	Saponification value	179.84
Iodine value	76.4		

โดยพบว่า กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบ คือ กรด Palmitic 55.9 เปอร์เซนต์, กรด stearic 8.3 เปอร์เซนต์, กรด oleic 22.75 เปอร์เซนต์, กรด linoleic 6.8 เปอร์เซนต์ และ arachidic 1.7 เปอร์เซ็นต์และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mehmood et al. (1984) ที่ได้ทำการศึกษาโดยการแยกองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดเอื้องหมายนาและได้รายงานว่า พบสารประกอบ quinone ใหม่ คือ สาร -dihydrophytylplastoquinone และสาร 6-methyl ต่อเป็นสายตรงกับ alpha-tocopherolquinone

นอกจากนี้ยังได้นำสารสกัดหยาบทั้ง 9 ชนิด ไปทดสอบฤทธิ์ต้านชีวภาพ ได้ผลการทดสอบดังหัวข้อ 4.5

4.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเอื้องหมายนา

เมื่อนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* เทียบกับสารมาตรฐาน Ampicillin การต้านแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* เทียบกับสาร Gentamicin และ Ceftazidime และการต้านยีสต์ *Candida albican* เทียบกับสาร Flukonazole ดังแสดงในตารางที่ 4-11, 4-12 และ 4-13

ตารางที่ 4-11 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกของสารสกัดหยาบ เอื้องหมายนา

จุลินทรีย์	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของ control	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของสารสกัดหยาบเอื้องหมายนา									
		เหง้า				ใบ			ต้น		
	Ampicillin 10 mg/disc	DMSO ± SD	เฮกเซน ± SD	ไดคลอโรมีเทน ± SD	เมทานอล ± SD	เฮกเซน ± SD	ไดคลอโรมีเทน ± SD	เมทานอล ± SD	เฮกเซน ± SD	ไดคลอโรมีเทน ± SD	เมทานอล ± SD
แบคทีเรียแกรมบวก *Staphyllo-coccus aureus*	32 ± 0.00	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งเป็นอิสระต่อกัน แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4-12 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบของสารสกัดหยาบเอื้องหมายนา

จุลินทรีย์	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของ control	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) สารสกัดหยาบเอื้องหมายนา									
		เหง้า				ใบ			ต้น		
		DMSO ± SD	เฮกเซน ± SD	ไดคลอโรมีเทน ± SD	เมทานอล ± SD	เฮกเซน ± SD	ไดคลอโรมีเทน ± SD	เมทานอล ± SD	เฮกเซน ± SD	ไดคลอโรมีเทน ± SD	เมทานอล ± SD
แบคทีเรียแกรมลบ											
Escherichia- coli	Gentamicin (10 µg/ disc) 11 ± 0.00	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
Pseudomonas-aeruginosa	Ceftazidime (30µg/ disc) 10 ± 0.00	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งเป็นอิสระต่อกัน แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4-13 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้งยีสต์ของสารสกัดหยาบเอื้องหมายนา

จุลินทรีย์	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของ control	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) สารสกัดหยาบเอื้องหมายนา									
		เหง้า				ใบ			ต้น		
		DMSO ± SD	เฮกเซน ± SD	ไดคลอโรมีเทน ± SD	เมทานอล ± SD	เฮกเซน ± SD	ไดคลอโรมีเทน ± SD	เมทานอล ± SD	เฮกเซน ± SD	ไดคลอโรมีเทน ± SD	เมทานอล ± SD
ยีสต์ *Candida-albican*	Flukonazole (25 µg/ disc) 2 ± 0.00	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งเป็นอิสระต่อกัน แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

จากตารางการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Agar Disc Diffusion พบว่าสารสกัดหยาบเอื้องหมายนาในทุก ๆ ตัวอย่างมีปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อแผ่น (10 µl/ disc) มีแนวโน้มที่ไม่ยับยั้งและไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก *Staphyllococcus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* และไม่สามารถยับยั้งยีสต์ *Candida albicans* ได้โดยเทียบกับสารควบคุมคือ Ampicillin, Gentamicin, Ceftazidime และ Flukonazol โดยอาจเกิดจากความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมีปริมาณน้อยเกินไปหรืออาจเกิดจากตัวทำละลายที่ใช้ ทำให้คุณสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen และคณะ (2008) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของพืชตระกูลขิงที่พบในประเทศไต้หวัน โดยทำการศึกษาในส่วนเหง้าของพืชตระกูลขิงทั้งหมด 18 ชนิด 5 วงศ์ คือวงศ์ *Alpinia* จำนวน 9 ชนิด วงศ์ *Costus speciosus* (Koenig) Smith จำนวน 1 ชนิด วงศ์ *Curcuma* จำนวน 4 ชนิด วงศ์ Hedychium จำนวน 1 ชนิด วงศ์ *Vanoverberghia sasakiana* จำนวน 1 ชนิด และวงศ์ *Zingiber* จำนวน 2 ชนิด นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล แล้วนำไปหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteau method ทดสอบความสามารถในการขจัด 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) ทดสอบ reducing power และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่า พืชในวงศ์ *Alpinia* และ genus *Curcumas* มีปริมาณ ฟีนอลิกรวมเฉลี่ย 17.01 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 30.02 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และพบค่าสูงที่สุดใน *Vanoverberghia sasakiana* คือ 36.50 มิลลิกรัมต่อกรัม ปริมาณสารต้านออกซิเดชันมีฤทธิ์ต้านที่ดี (89 เปอร์เซนต์) ในวงศ์ *Vanoverberghia* และ *Hedychium* ส่วนฤทธิ์ต้าน DPPH มีค่าใกล้เคียงกัน โดยในวงศ์ *Zingiber oligophyllum* พบในปริมาณต่ำที่สุด นอกจากนี้พืชที่ทดสอบส่วนใหญ่ต้านแบคทีเรียได้ แต่วงศ์ *Hedychium* และวงศ์ *Vanoverberghia* ไม่สามารถต้านเชื้อ *Escherichia coli* และ *Vibrio parahaemolyticus*

จากการวิจัยหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งสองวิธีคือ DPPH assay และ FRAP assay รวมทั้งการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม พบว่ามีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือฤทธิ์ในการต้านอนุมูล DPPH , ความสามารถในการรีดิวส์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในสารสกัดหยาบเมทานอลในส่วนเหง้าสูงกว่าปริมาณที่พบในตัวทำละลายเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนจากส่วนใบและต้น โดยถึงแม้ว่า ความสามารถในการรีดิวส์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ในไดคลอโรมีเทนจากส่วนต้นจะมีค่าสูงที่สุด แต่ก็มีค่าใกล้เคียงกันกับสารสกัดหยาบเมทานอลจากส่วนเหง้า ส่วนการหาองค์ประกอบทางเคมี พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลจากส่วนเหง้ามีองค์ประกอบทั้งหมด 18 ชนิด พบสารประกอบฟีนอลที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ 4-methyl-2,6-di-tert-butylphenol (0.61 เปอร์เซนต์) และกรดไขมัน palmitic acid (C16, 1.66 เปอร์เซนต์) และ เอสเทอร์ของกรดไขมัน 4 ชนิดในปริมาณเล็กน้อย นอกจากนี้ในการทดสอบฤทธิ์

ทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดหยาบทุกชนิดมีแนวโน้มไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Staphyllococcus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* และไม่สามารถยับยั้งยีสต์ *Candida albicans* ได้โดยเทียบกับสารควบคุมคือ Ampicillin, Gentamicin, Ceftazidime และ Flukonazol

จากการวิจัยนี้ข้อมูลที่ได้เป็นหลักฐานที่แสดงถึงฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน, องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านทางชีวภาพของเอื้องหมายนาที่พบทั่วไป ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ เช่น การถนอมอาหารที่มีองค์ประกอบของไขมัน เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง และสามารถพัฒนาเป็นยารักษาโรคที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคความจำเสื่อม และโรคไขข้อเป็นต้น

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

ผลการสกัดส่วนเหง้า ใบ และต้นของเอื้องหมายนา (*Costus speciosus* Smith) โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล เพื่อศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชนิดต่าง ๆ โดยวิธี DPPH และวิธี FRAP assays การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบ สามารถสรุปได้ดังนี้

1. ปริมาณสารสกัดหยาบเฮกเซนจากส่วน เหง้า ใบและต้นเอื้องหมายนา คิดเป็นร้อยละ 0.48, 0.71 และ 1.43 สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากส่วนเหง้า ใบและต้น คิดเป็นร้อยละ 2.46, 3.46 และ 5.08 และสารสกัดหยาบเมทานอลจากส่วนเหง้า ใบและต้น ร้อยละ 7.37, 10.38 และ 11.79 ตามลำดับ

2. ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแต่ละชนิดโดยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดทุกชนิดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพิ่มขึ้น โดยสารสกัดเมทานอลของเหง้าเอื้องหมายนามีความสามารถในการด้านอนุมูลอิสระสูงสุดคือ 50.33 ± 0.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 204.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดทุกชนิดมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่ต่ำกว่าสารมาตรฐาน Ascorbic และ BHT (16.09 และ 23.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

3. ผลการตรวจสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบแต่ละชนิด โดยวิธีการรีดิวส์เหล็ก (FRAP assay) พบว่า สารสกัดหยาบทุกชนิดมีสามารถในการรีดิวส์ Fe^{3+} ให้เป็น Fe^{2+} โดยส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากส่วนต้นมีค่า FRAP สูงที่สุด (172.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบทุกชนิดมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันต่ำกว่าสารมาตรฐาน $FeSO_4$ (214.46 ± 1.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

4. สารสกัดหยาบเมทานอลจากเหง้าเอื้องหมายนามีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงสุด เท่ากับ 36.25 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อกรัม และพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมกับฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH มีความสัมพันธ์กัน โดยถ้าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมมีค่าสูง ค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูล DPPH ได้ 50 %) จะมีค่าต่ำ (ค่า IC_{50} ต่ำจะกำจัดอนุมูล DPPH ได้ดี) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี

5. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเมทานอลจากส่วนเหง้าเอื้องหมายนาด้วยเทคนิค GC/MS พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีทั้งหมด 18 ชนิด โดยตรวจพบสารที่มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ 6 ชนิดคือ สารประกอบฟีฟีนอล 1 ชนิด คือ 4-methyl-2,6-di-tert-butylphenol (0.61 เปอร์เซนต์) กรดไขมัน 1 ชนิด คือ palmitic acid (1.66 เปอร์เซนต์) และเอสเทอร์ของกรดไขมัน 4 ชนิด คือ methyl linoleate (1.17 เปอร์เซนต์), methyl laurate (0.13เปอร์เซนต์), methyl palmitoleinate (0.13 เปอร์เซนต์), และ methyl 9,12,15, octadecatrienoate (0.10 เปอร์เซนต์)

6. ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Agar Disc Diffusion พบว่าสารสกัดหยาบเอื้องหมายนาทุก ๆ ตัวอย่างปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อแผ่น (10 ul/ disc) ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก *Staphyllococcus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* และไม่สามารถยับยั้งยีสต์ *Candida albicans* ได้โดยเทียบกับสารควบคุมคือ Ampicillin, Gentamicin, Ceftazidime และ Flukonazol ตามลำดับ

5.1 ข้อเสนอแนะ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากพืชสมุนไพรเอื้องหมายนา โดยใช้วิธีการสกัดเป็นลำดับอย่างง่ายด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดที่มีขั้วต่างกัน และศึกษาสมบัติต้านอนุมูลอิสระเพียง 2 วิธีเท่านั้น หากจะทราบข้อมูลละเอียดของสารสกัดสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เป็นประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้ จะต้องมีการศึกษาในรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ มีเพียง 2 วิธี คือ วิธี DPPH assay และ FRAP ซึ่งเป็นเพียงส่วนหนึ่งของการทดสอบเท่านั้น ดังนั้นจึงควรมีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในวิธีการอื่นๆอีกด้วย

2. ควรมีการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบในส่วนอื่น ๆ ด้วย

3. ในการสกัดสารควรใช้พืชที่แห้ง บดให้ละเอียดและทดลองใช้ตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ เพื่อให้ได้สารสกัดในปริมาณมากเพื่อใช้ประโยชน์ในเชิงพานิชย์ต่อไป

4. ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Agar Disc Diffusion สารสกัดที่ได้อาจมีความเข้มข้นน้อยและผ่านการทำให้แห้งด้วย rotary evaporator และเก็บไว้นานจึงทำให้สารสกัดที่ได้มีคุณสมบัติที่เปลี่ยนไป ดังนั้นในการทดสอบครั้งต่อไปควรมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด รวมทั้งเลือกตัวทำละลายและวิธีการสกัดสารที่เหมาะสม

บรรณานุกรม

กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นที่ของสารละลายมาตรฐานและการใช้ประโยชน์เพื่อหาค่าเข้มข้นของสารตัวอย่าง. (2556). เข้าถึงได้จาก http://en.wikipedia.org/wiki/Standard_curve.

การทำงานของวิตามินอี ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในไขมัน. (2556). เข้าถึงได้จาก www.karger.com/Article/Fulltext/343104.

กันญารัตน์ ภิรมย์มั่น. (2550). *ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากต้นกระทือป่า และว่านริดสีดวง*. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต, ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

โครงสร้างของกรดแอสคอบิก. (2556). เข้าถึงได้จาก http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/09/Ascorbic-acid-2D-skeletal.png.

จักรพันธ์ จุลศรีไกวัล. (2550). *องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จำลอง เพ็งคล้าย. (2534). *พรรณไม้ป่าพรุจังหวัดนราธิวาส*. กรุงเทพฯ: ส.สมบูรณ์การพิมพ์.

ความมีขั้วและไม่มีขั้วของสาร. (2556). เข้าถึงได้จาก http://chemsci.kku.ac.th/crystal/cryst05.html.

นันทวัน บุญยะประภัศร. (2534). *การสกัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสำคัญจากสมุนไพร*. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย, คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล.

บัญญัติ สุขศรีงาม. (2536). *จุลชีววิทยา*. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

ปริยานุช อินทร์รอด. (2551). *ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง*. โครงการวิจัยวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

พัชรี คล้ายวัฒนะ. (2550). *ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากต้นขิงแม่โขง*. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต, ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม. (2535). *Principles and Techniques of Intrumental Analysis*, กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์.

ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์ และทรงพร จึงมั่นคง. (2549). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารฟีนอลรวมของสารสกัดพืชสมุนไพรบางชนิด. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*, 76-88.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2547). *การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร*.กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

หลักการวิเคราะห์สารโดยเทคนิคแอบซอบชันสเปกโตรสโกปี. (2556). เข้าถึงได้จาก http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php.

โอภา วัชระคุปต์. (2549). *สารต้านอนุมูลอิสระ*. กรุงเทพฯ: พีเอสพริ้นท์.

เอื้องหมายนา. (2556). เข้าถึงได้จาก http://www.eto.ku.ac.th/neweto/e-book/plant/flower/wildginger.pdf.

Alcamo, E. J. (1997). *Fundamentals of Microbiology* (5th ed.). California : Addision Wesley Longman.

Anonymous. (2007). *The Wealth of India.* First Supplement Series (Raw Materials), National Institute of Science Communication and Information Resources. *CSIR* , *2*, 211, 213.

Ayoola, A. G., Ipav, S. S., Sofidiya, M. O., Adepoju-Bello, A. A., Coker, A. B., & Odgbemi, T. O. (2008). Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of *Allanblackia floribunda Oliv (Guttiferae). International Journal of Health Research*, *1*, 87-93.

Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S., Das, D., Ray, S., Kuszynski, C., Joshi, S., & Pruess, H. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, *148*, 187-197.

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ''antioxidant power'' The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, *239*, 70–76.

Brown, Micheal, R. W., & Gilbert, P. (1995). *Microbiological Quality Assurance*. Boca Raton : CRC Press.

Chakraborthy, G. S. (2009). Free radical scavenging activity of *Costus speciosus* leaves. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *43*, 96-98.

Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., & Omar, M. (2007). Antioxidant and antibacterial activity of leaves of Etlingera species (Zingiberaceae) in Penisular Malaysia. *Food Chemistry, 104*, 1586-1593.

Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Wong, L.F., Lianto, F.S., Wong, S.K., Lim, K.K., Joe, C.E., & Lim, T.Y. (2008). Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry, 109*, 477-483.

Chang, L. W., Yen, W. J., Huang, S. C., & Duh, P. D. (2002). Antioxidant activity of sesame coat. *Food Chemistry, 78*, 347-354.

Chaudhuri, S. R., Modak, A., Bhaumik, A., & Swarnakar, S. (2011). Phloroglucinol derivatives as potential antiulcer compound that inhibits matrix metalloproteinase-9. *International Journal of Pharmaceutical Applications, 2*, 237-252.

Chen, I-Nan, Chen-Chin Chang, Chang-Chai Ng, Chung-Yi Wang, Yuan-Tay Shyu, & Tsu-Liang Chang. (2008). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Zingiberaceae Plant in Taiwan. *Plant Foods Hum Nutr, 63*, 15-20.

Chu, Y. H., Chang, C. L., & Hsu, H. F. (2000). Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 80*, 561-566.

Collins, C. H., Lyne, M. P., & Grange, J. M. (1989). *Collins and Lyne' s Microbiological Methods* (6th ed.). Oxford : Buterworth-Heinemann.

Habsah, M., Amran, M., Mackeen, M.M., Lajis, N.H., Kikuzaki, H., Nakatani, H., Rahman, A., Ghafar, A., & Ali, A.M. (2000). Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of Ethnopharmacol, 72*, 403-410.

Hakimuddin, F., Piliyath, G., & Meckling, K. (2004). Selective cytotoxicity of a red grape wine flavonoid fraction against MCF-7 cells. *Breast Can Reserch Treatment, 85*, 65-79.

Howell, N.K., & Saeed, S. (1999). The effect of antioxidants on the production of lipid oxidation products and transfer of free radicals in oxidized lipid-protien systems. In Basu,T.K., Temple, N.J., & Garg, M.L.(Eds.), *Antioxidants in human health and disease* (pp. 43-54).

Hsieh, T. J., Lui, T. Z., Chia, Y. C., Chern, C. L., Chuang, M. C., & Mau, S. Y. (2004). Protective effect of methyl gallate from *Toona sinensis (Meliaceae)* against hydrogen peroxide-

induced oxidative stress and DNA damage in MDCK cells. *Food and Chemical Toxicology*, *42*, 843-850.

Ingraham, J. L., & Ingraham, C. A. (1995). *Introduction to Microbiology.* Belmont, CA : Wadsworth.

Jaitak, V., Sharma, K., Kalia, K., Kumar, N., HP, S., Kaul, V., & Singh, B. (2010). Antioxidant activity of *Potentilla fulgens*: An alpine plant of western Himalaya. *Journal of Food Composition and Analysis*, *23*, 142-147.

Jha, M. K., Alam, M. B., Hossain, M. S., & Islam, A. (2010). In vitro antioxidant and cytotoxic potential of *Costus speciosus* (Koen.) Smith rhizome. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *1*, 138-144.

Kleyn, J., & Bicknell, M. (1999). *Microbiology Experiments* : *A Health Science Perspective* (2nd ed.). Boston : McGraw-Hill.

Koneman, W. E., Allen, D. S., Janda, M. W., Schreckenberger, C. P., & Washington, C. (1994). *Introduction to Diagnostic Microbiology.* Philadelphia : J. B. Lippincott.

Loo, A., Jain, K., & Darah, I. (2007). Antioxidant and radical scavenging activities of the pyroligneous acid from a mangrove plant, *Rhizophora apiculata. Food Chemistry*, *104*, 300-307.

Mahmood, U., Shukla,Y. N., & Thakur, R. S. (1984). *Phytochemistry*, *23*(8), 1725-1727.

Mckane, L., & Kandel, J. (1996). *Microbiology* (2nd ed.). New York : McGraw-Hill.

Miquel, J., Bernd, A., Sempere, J.M., Diaz-Alperi, J., & Ramírez, A. (2002). The *curcuma* antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. Arch. Gerontol. *Geriatrics*, *34*, 37–46.

Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Dominguez, H., Jose Nunez, M., Parajo, J. Dominguez, J., & Cruz, J. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, *72*, 145-171.

Nagai, T., Myoda, T., & Nagashima, T. (2005). Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense L. Food Chemistry*, *91*, 389-394.

Nawar, W. W. (1996). Lipid. In Fennema, O. R. (Ed.), *Food Chem* (pp. 210-243).

Nester, E. W., Evans, C. R., & Martha, T. N. (1995). *Microbiology*. Dudugue : Wm. C. Browm.

O' Donnell, V., Tayler, B., Parthasarthyl, S., Korn, H., Koesling, D., & Friebe, A. (1999). 15-lipoxygenase catalytically consumes nitric oxide and impairs activation of guanylate cytase. *Biology Chemistry*, *274*(29), 20083-20091.

Olajire, A. A., & Azeez, L. (2011). Total antioxidant activity, phenolic flovonoid and ascorbic acid contents of Nigerian vegetables. *African Journal of Food Science and Technology*, *2*, 22-29.

Pelezar, M. J. (1958). *Laboratory Exercises in Microbiology* (2nd ed.). New York : McGraw-Hill.

Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2001). *Antioxidants in food: practical applications*. New York: CRC Press.

Prakash, D., Singh, B. N., & Upadhyay, G. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of phenol from onion *(Allium cepa)*. *Journal of Food chemistry*, 1389-1393.

Praveen Kumar, P., Kumaravel, S., & Lalitha, C. (2010). Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negundo*. *African Journal of Biochemistry Research*, *4*, 191-195.

Shetty, K. (1997). Biotechnology to harness the benefits of dietary phenolic: focus on *Lamiaceae*. *Asia Pacific Journal of Clin. Nutr.*, *6*, 162-171.

Shruti, S., Pradeep, S., Garima, M., Jha, K. K., & Khosa, R. L. (2011). *Costus speciosus* (Keukand). *A review*, *2*, 118-128.

Sirat, H.M., Rahman, A.A., Itokawa, H., & Morita, H. (1996). Constituents of the rhizomes of two *Alpinia* species of Malaysia. *Planta. Medical*, *62*, 188-189.

Soares, J. R., Dins, T. C. P., Cunha, A. P., & Almeida, L. M. (1997). Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Research*, *26*, 469-478.

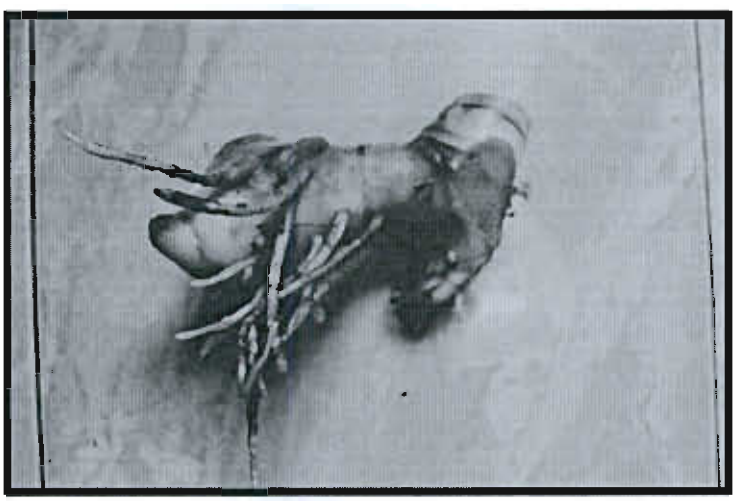
Tortora, G. J., Berdell, R. F., & Christine, L. C. (1995). *Microbiology* (5th ed.). California : Benjamin/Cummings.

Vijayalakshmi, M. A., & Sarada, N. C. (2008). Screening of *Costus speciosus* extracts for antioxidant activity. *Fitoterapia*, *79*, 197–198.

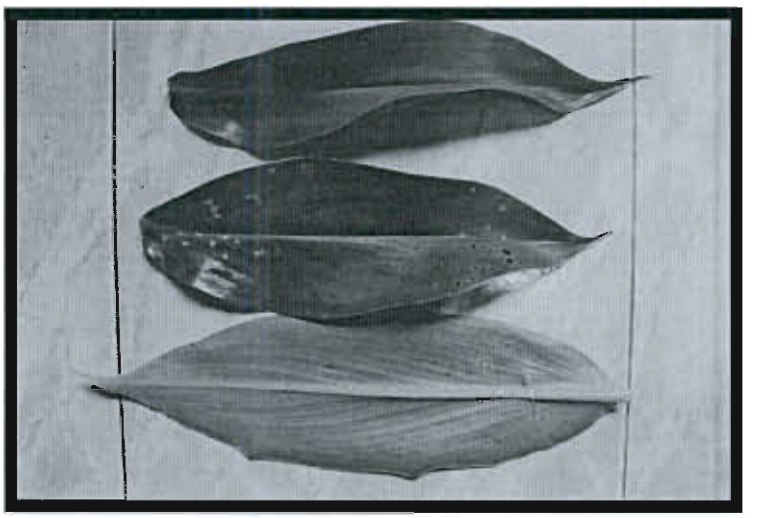
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
รูปส่วนต่าง ๆ ของเอื้องหมายนา

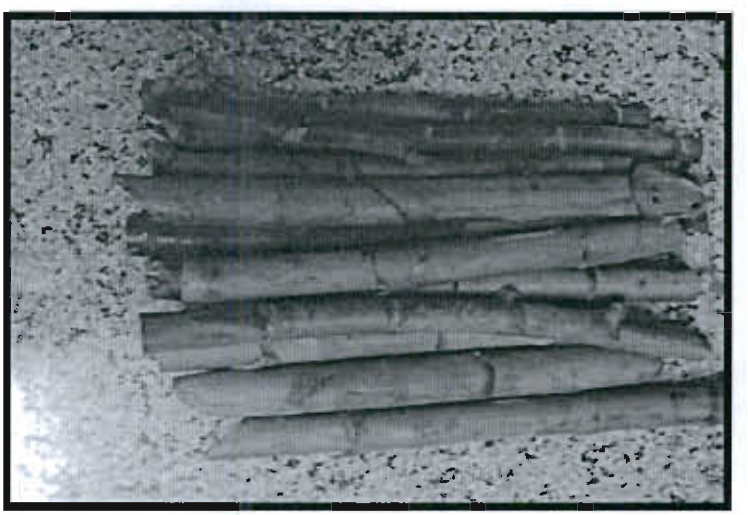
ภาพภาคผนวก ก-1 ต้นเอื้องหมายนา



ภาพภาคผนวก ก-2 เหง้าเอื้องหมายนา



ภาพภาคผนวก ก-3 ใบเอื้องหมายนา



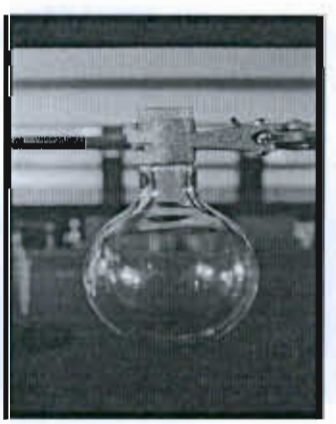
ภาพภาคผนวก ก-4 ลำต้นเอื้องหมายนา

ก-5

ก-6

ก-7

ภาพภาคผนวก ก-5 เหง้าเอื้องหมายนาแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน
ภาพภาคผนวก ก-6 ใบเอื้องหมายนาแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน
ภาพภาคผนวก ก-7 ต้นเอื้องหมายนาแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน



ก-8

ก-9

ก-10

ภาพภาคผนวก ก-8 สารสกัดหยาบเฮกเซนจากเหง้าเอื้องหมายนา
ภาพภาคผนวก ก-9 สารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบเอื้องหมายนา
ภาพภาคผนวก ก-10 สารสกัดหยาบเฮกเซนจากต้นเอื้องหมายนา

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมี

1. เตรียมสารละลาย 0.2 มิลลิโมลาร์ DPPH ในเมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

(M.W. = 394.33)

จาก g / M.W. = CV / 1000

$g = (0.2 \times 10^{-3}) \times 10 \times 349.33 / 1000$

g = 0.00078 กรัม

ดังนั้นชั่งสาร DPPH 0.00078 กรัม ละลายในเมทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลาย ascorbic acid ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

โดยชั่งสาร ascorbic acid 0.01 กรัม ละลายในเมทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3. เตรียมสารละลาย BHT ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

โดยชั่งสาร BHT 0.01 กรัม ละลายในเมทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร

4. เตรียมสารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเมทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

โดยชั่งสาร gallic acid 0.02 กรัม ละลายในเมทานอลปริมาตร 20 มิลลิลิตร

5. เตรียมสารละลาย 7% sodium carbonate ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

โดยชั่งสาร sodium carbonate 17.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตร

6. เตรียมสารละลาย $FeSO_4.7H_2O$ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่น ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

โดยชั่งสาร $FeSO_4.7H_2O$ 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

การหาค่า IC_{50} ในการกำจัดอนุมูล DPPH

1. การหาค่า IC_{50} ของ ascorbic acid

จากสมการ $y = 17.933x$

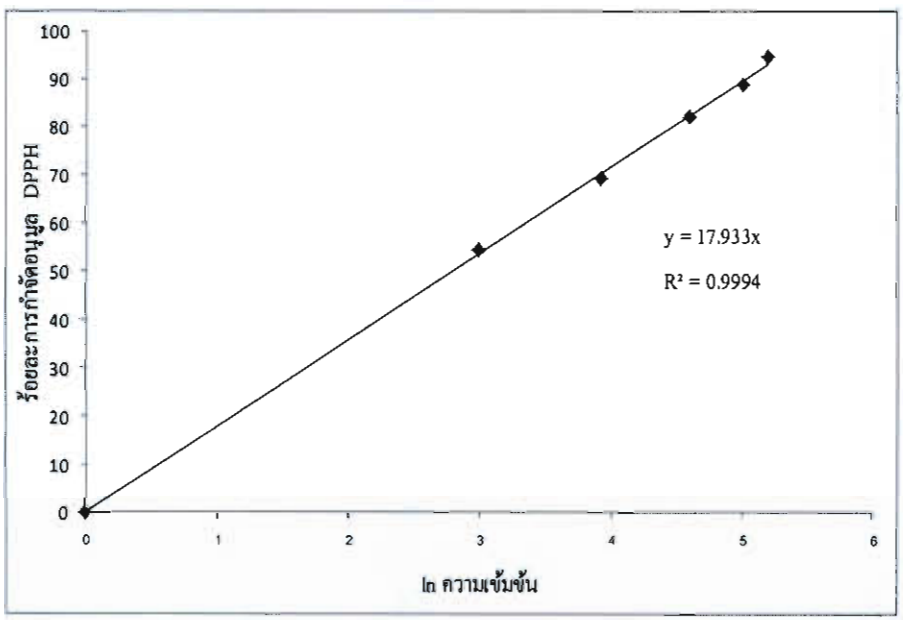
แทนค่า $y = 50$ $\quad 50 = 17.933x$

$x = 2.788$

$x = \ln$(ความเข้มข้น), $\ln = x$

ความเข้มข้นสาร = e^x

ดังนั้นความเข้มข้นสาร = 16.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพภาคผนวก ค-1 กราฟสมการในการคำนวณ IC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน ascorbic acid

2. การหาค่า IC_{50} ของ BHT

จากสมการ y = 15.798x

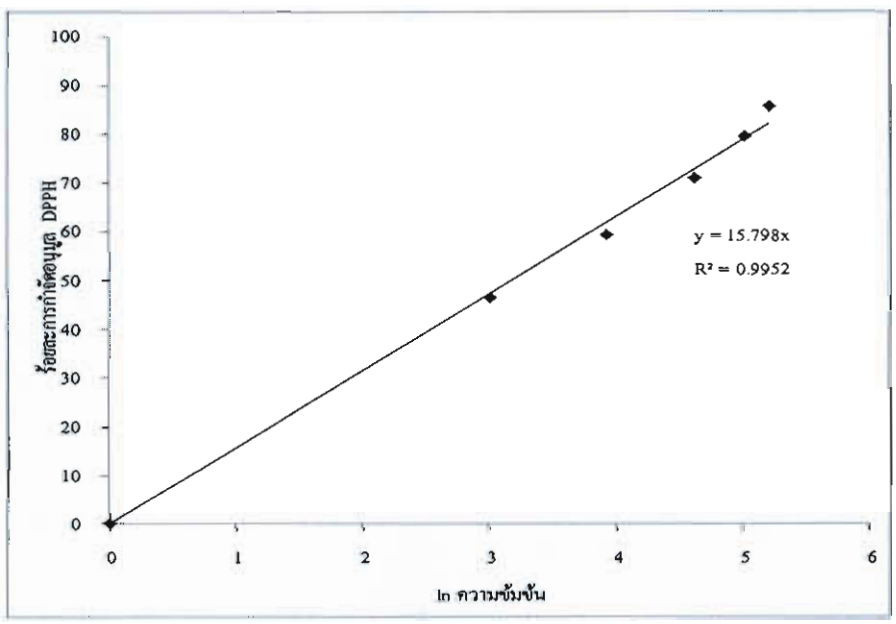
แทนค่า y = 50 $\quad 50 = 15.798x$

$x = 3.16$

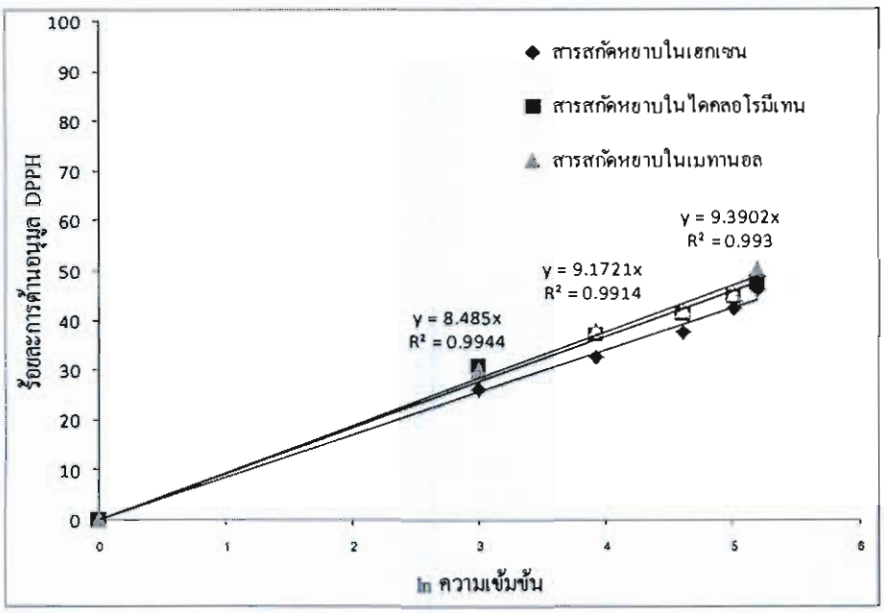
$x = \ln$(ความเข้มข้น), $\ln = x$

ความเข้มข้นสาร = e^x

ดังนั้นความเข้มข้นสาร = 23.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพภาคผนวก ค-2 กราฟสมการในการคำนวณ IC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน BHT



ภาพภาคผนวก ค-3 กราฟสมการในการคำนวณ IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากเหง้าเอื้องหมายนา

3. การหาค่า IC_{50} ของเหง้าเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเฮกเซน

จากสมการ $y = 8.485x$

แทนค่า $y = 50$ $\quad 50 = 8.485x$

$x = 5.82$

$x = \ln(\text{ความเข้มข้น}), \ln = x$

ความเข้มข้นสาร $= e^{x}$

ดังนั้นความเข้มข้นสาร = 336.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การหาค่า IC_{50} ของเหง้าเอื้องหมายนาในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน

จากสมการ $y = 9.172x$

แทนค่า $y = 50$ $\quad 50 = 9.172x$

$x = 5.45$

$x = \ln(\text{ความเข้มข้น}), \ln = x$

ความเข้มข้นสาร $= e^{x}$

ดังนั้นความเข้มข้นสาร = 232.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5. การหาค่า IC_{50} ของเหง้าเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเมทานอล

จากสมการ y = 9.3902x

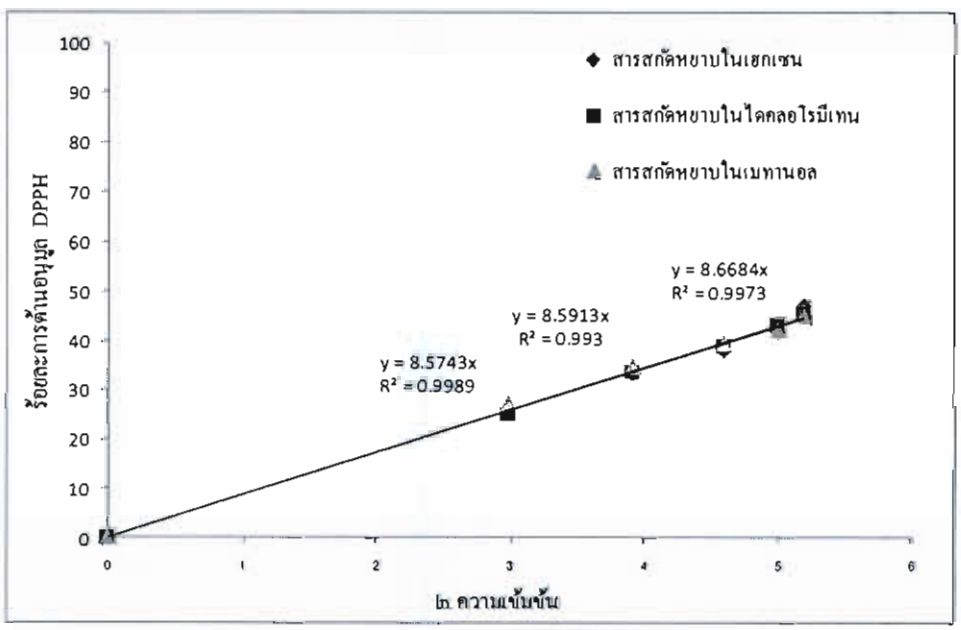
แทนค่า y = 50 50 = 9.3902x

x =

x = ln(ความเข้มข้น), ln = x

ความเข้มข้นสาร = e^x

ดังนั้นความเข้มข้นสาร = 204.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพภาคผนวก ค-4 กราฟสมการในการคำนวณ IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากใบเอื้องหมายนา

6. การหาค่า IC_{50} ของใบเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเฮกเซน

จากสมการ y = 8.5913x

แทนค่า y = 50 50 = 8.5913x

x = 5.81

x = ln(ความเข้มข้น), ln = x

ความเข้มข้นสาร = e^x

ดังนั้นความเข้มข้นสาร = 333.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7. การหาค่า IC_{50} ของใบเอื้องหมายนาในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน

จากสมการ $y = 8.5743x$

แทนค่า $y = 50$ $\quad 50 = 8.5743x$

$x = 5.83$

$x = \ln$(ความเข้มข้น), $\ln = x$

ความเข้มข้นสาร $= e^x$

ดังนั้นความเข้มข้นสาร = 340.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

8. การหาค่า IC_{50} ของใบเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเมทานอล

จากสมการ $y = x$

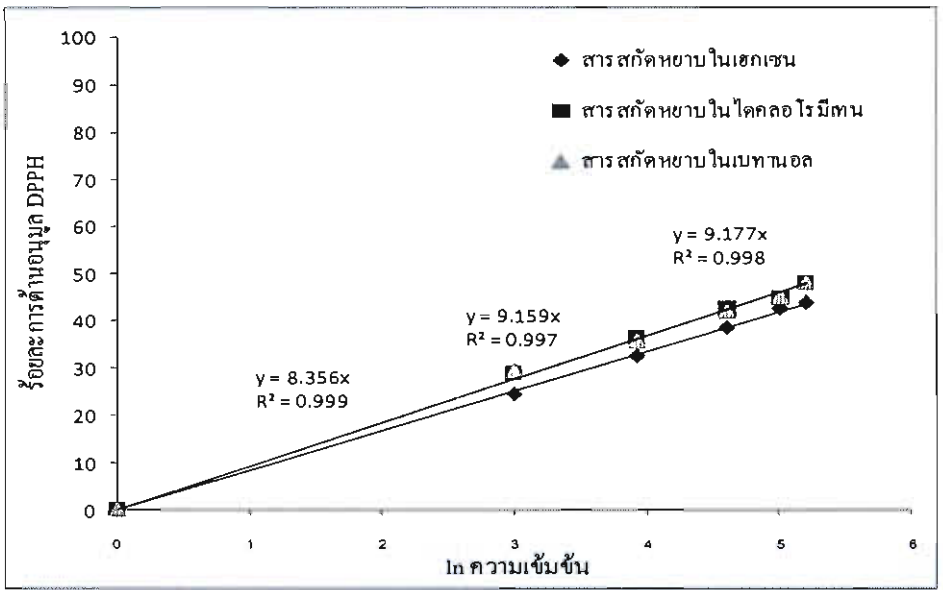
แทนค่า $y = 50$ $\quad 50 = 8.6684x$

$x = 5.77$

$x = \ln$(ความเข้มข้น), $\ln = x$

ความเข้มข้นสาร $= e^x$

ดังนั้นความเข้มข้นสาร = 320.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพภาคผนวก ค-5 กราฟสมการในการคำนวณ IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากต้นเอื้องหมายนา

9. การหาค่า IC_{50} ของต้นเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเฮกเซน

จากสมการ $y = 8.356x$

แทนค่า $y = 50$ $\quad 50 = 8.356x$

$x = 5.98$

$x = \ln$(ความเข้มข้น), $\ln = x$

ความเข้มข้นสาร $= e^x$

ดังนั้นความเข้มข้นสาร = 395.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

10. การหาค่า IC_{50} ของต้นเอื้องหมายนาในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน

จากสมการ $y = 9.177x$

แทนค่า $y = 50$ $\quad 50 = 9.177x$

$x = 5.45$

$x = \ln$(ความเข้มข้น), $\ln = x$

ความเข้มข้นสาร $= e^x$

ดังนั้นความเข้มข้นสาร = 232.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

11. การหาค่า IC_{50} ของต้นเอื้องหมายนาในตัวทำละลายเมทานอล

จากสมการ $y = 9.159x$

แทนค่า $y = 50$ $\quad 50 = 9.159x$

$x = 5.46$

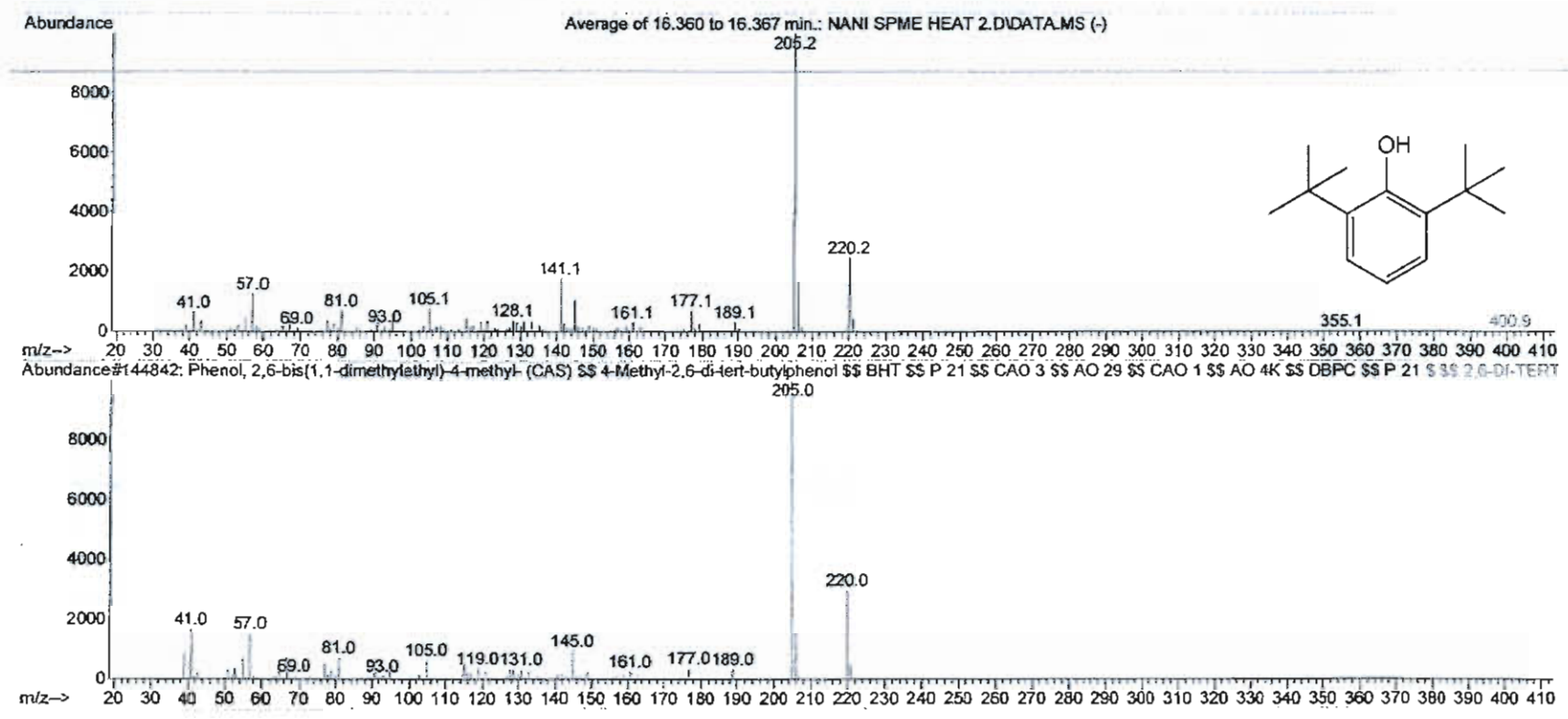
$x = \ln$(ความเข้มข้น), $\ln = x$

ความเข้มข้นสาร $= e^{x}$

ดังนั้นความเข้มข้นสาร $= 235.09$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

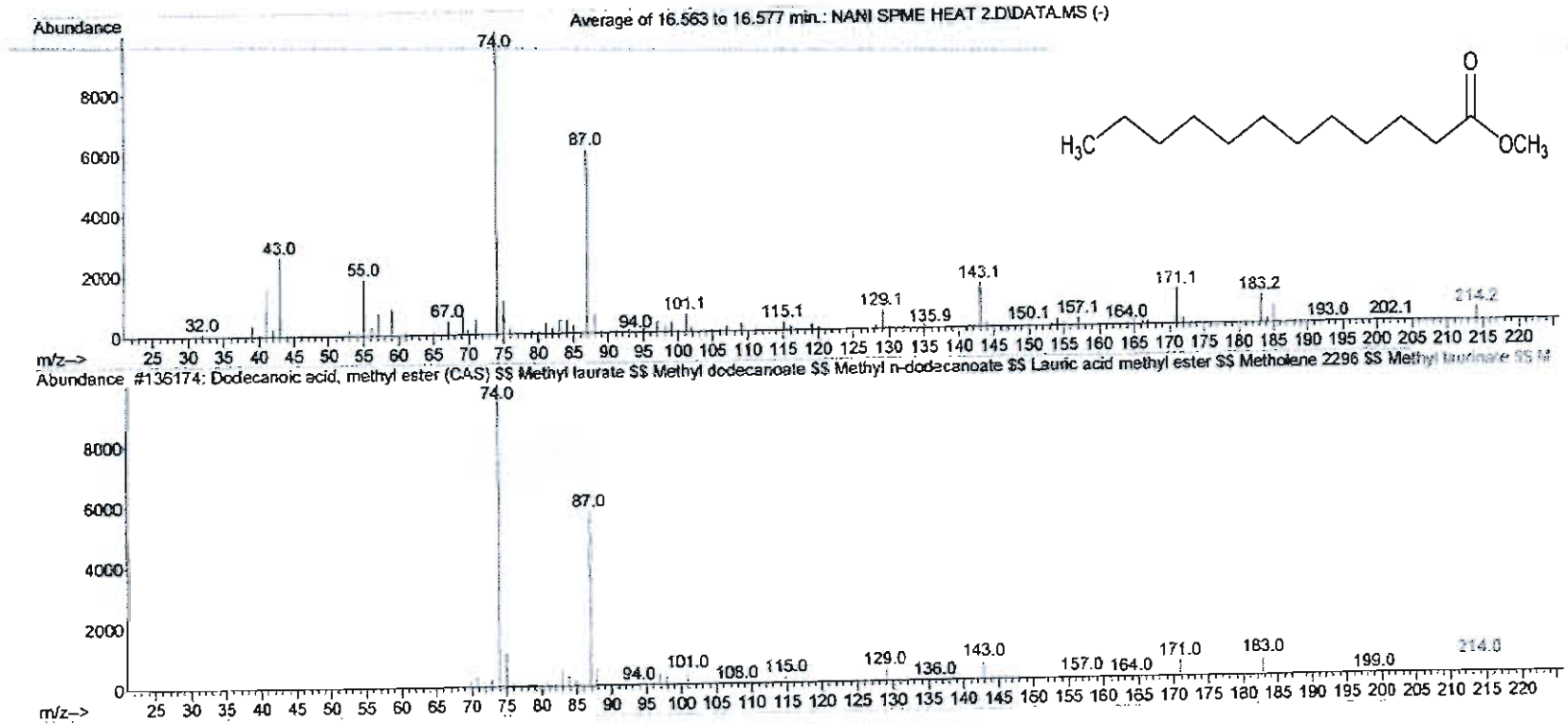
โครมาโทแกรมของสารสกัดจากเหง้าเอื้องหมายนา ในตัวทำละลายเมทานอลที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ



ภาพภาคผนวก ง-1 โครมาโทแกรมของสารสกัดเอื้องหมายนา ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library

Searched : wiley 7 N edition, Retention Time 16.37 minute, Quality : 98 %,

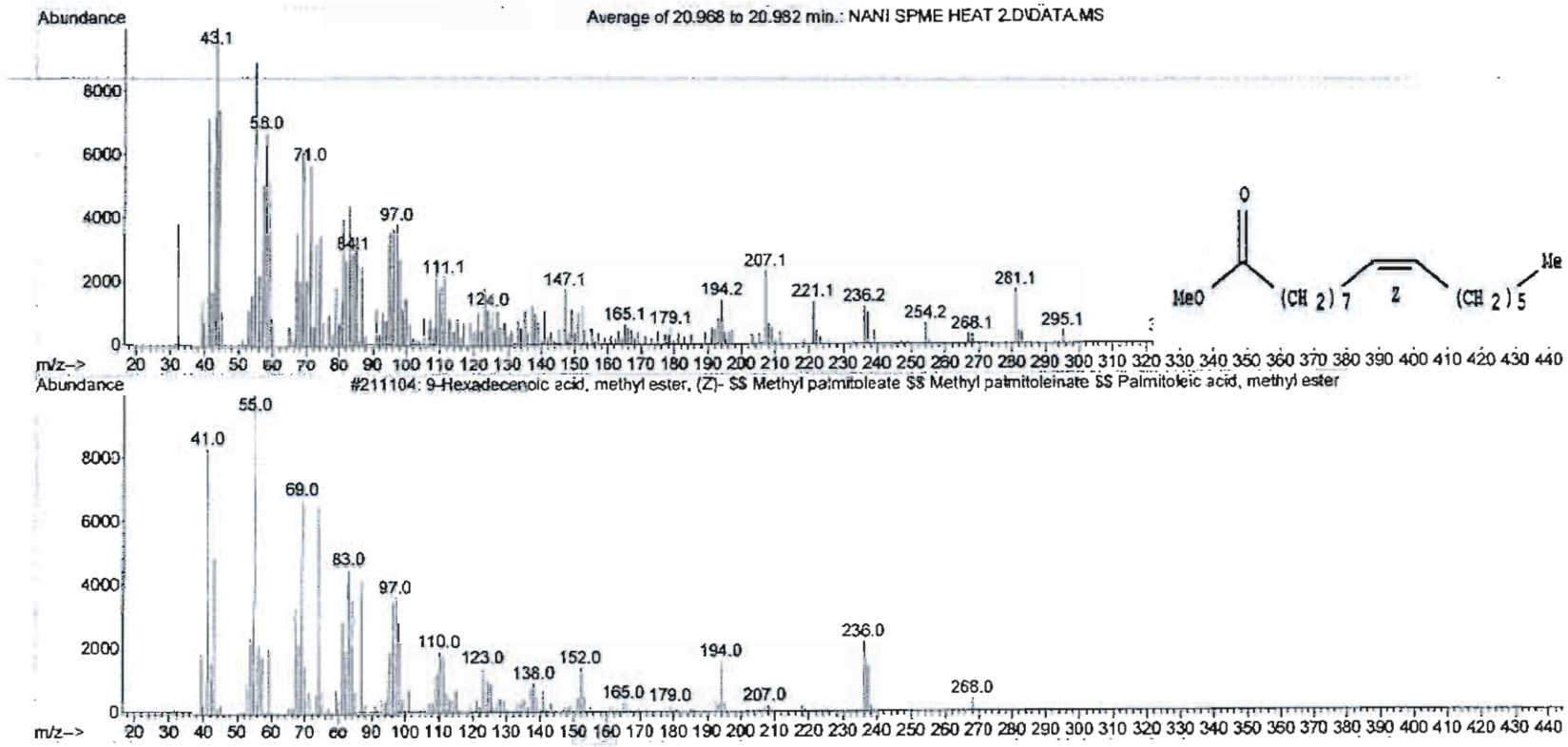
Total : 0.61 %, ID : 4-methyl-2,6-di-tert-butylphenol



ภาพภาคผนวก ง-2 โครมาโทแกรมของสารสกัดเอื้องหมายนา ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library

Searched : wiley 7 N edition, Retention Time 16.57 minute, Quality : 95 %,

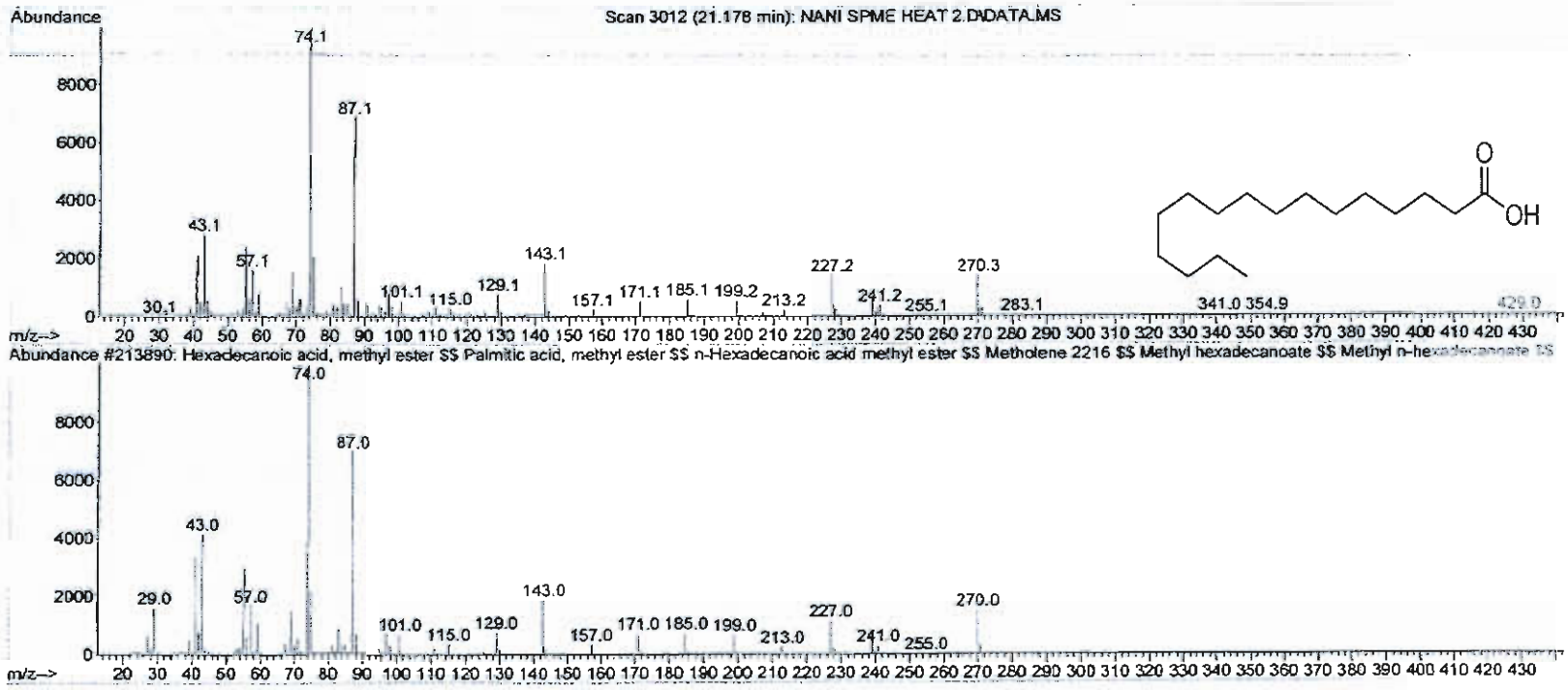
Total : 0.13 %, ID : methyl laurate



ภาพภาคผนวก ง-3 โครมาโทแกรมของสารสกัดเอื้องหมายนา ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library

Searched : wiley 7 N edition, Retention Time 20.97 minute, Quality : 53 %,

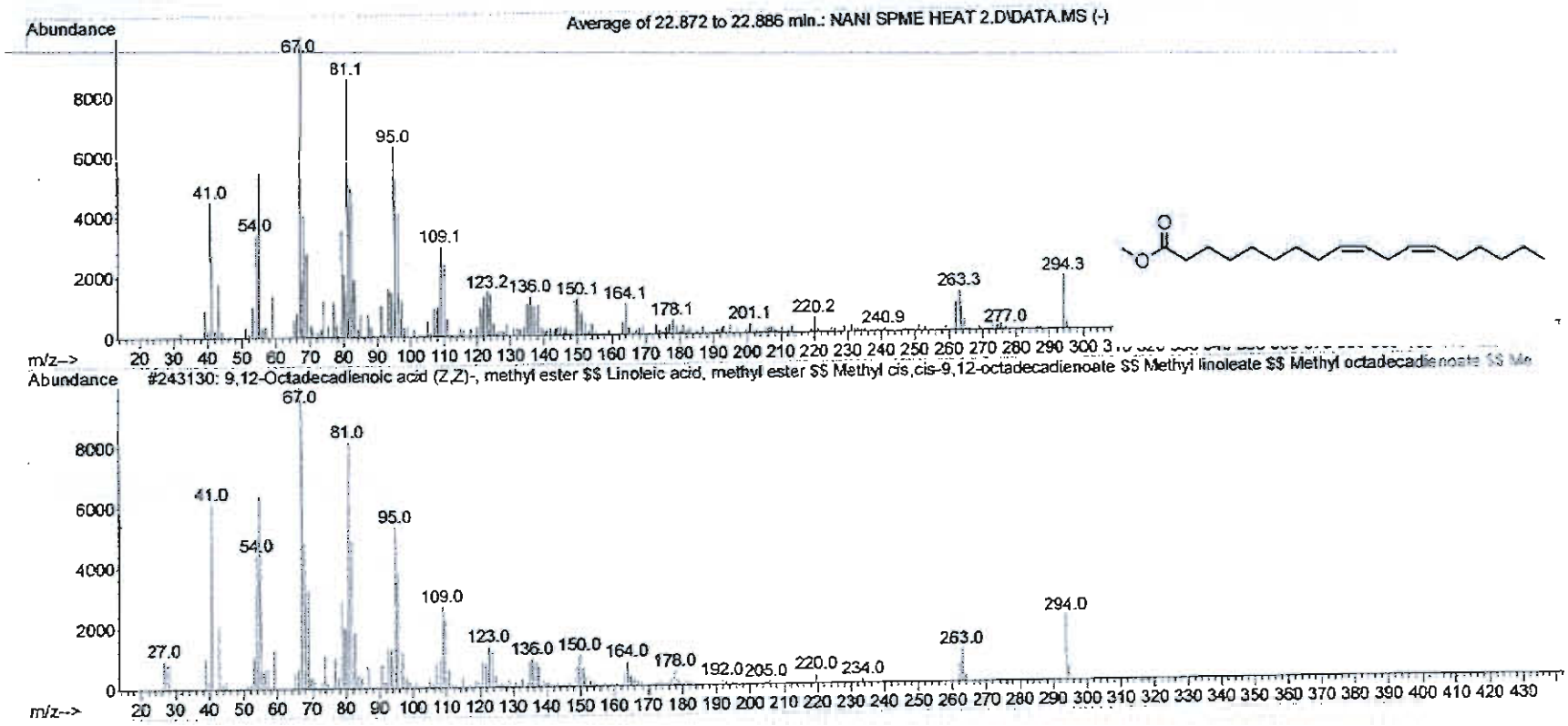
Total : 0.13 %, ID : methyl palmitoleinate



ภาพภาคผนวก ง-4 โครมาโทแกรมของสารสกัดเอื้องหมายนา ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library

Searched : wiley 7 N edition, Retention Time 21.18 minute, Quality : 99 %,

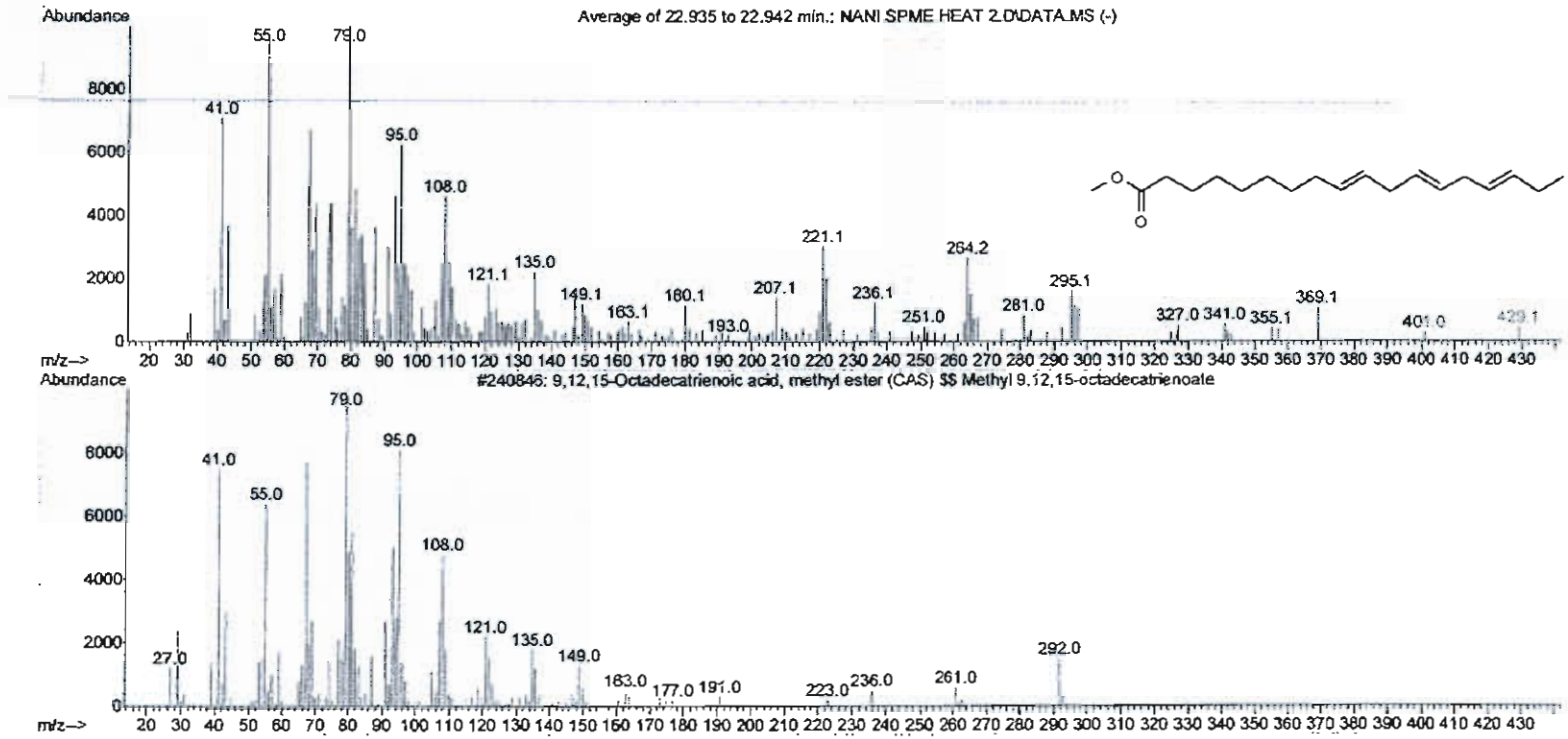
Total : 1.66 %, ID : palmitic acid



ภาพภาคผนวก ง-5 โครมาโทแกรมของสารสกัดเอื้องหมายนา ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library

Searched : wiley 7 N edition, Retention Time 22.88 minute, Quality : 99 %,

Total : 1.17 %, ID : methyl linoleate



ภาพภาคผนวก ง-6 โครมาโทแกรมของสารสกัดเอื้องหมายนา ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library

Searched : wiley 7 N edition, Retention Time 22.94 minute, Quality : 83 %,

Total : 0.10 %, ID : methyl 9,12,15, octadecatrienoate