องค์ประกอบทางเคมี การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของบอนหอม

สุรางค์รัตน์ แดงจิระ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พฤษภาคม 2558

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ สุรางค์รัตน์ แดงจิระ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธาน
(ดร. โสภณัฐ คงศรีประพันธ์)

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

.... กรรมการ
(ดร.ประภาพรรณ เตชะเสาวภาคย์)

.... กรรมการ
(ดร.อนันต์ อธิพรชัย)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)
วันที่ 31 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2558

การวิจัยนี้ได้รับทุนการศึกษา

ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์/ดุษฎีนิพนธ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปีงบประมาณ 2557

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จเร จรัสจรูญพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ช่วยเหลือในทุกปัญหาการวิจัย พร้อมทั้งให้กำลังใจ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ทุกท่าน ที่ช่วยสอนวิชาเคมีในส่วนของเนื้อหา และปฏิบัติการเคมีอย่างเข้มข้น เพื่อปลูกฝังให้ข้าพเจ้าเป็นนักวิทยาศาสตร์ และเป็นครูวิทยาศาสตร์ที่มีความรู้ในภาคทฤษฎี และภาคปฏิบัติวิชาเคมีเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุมาพร ทาไธสง อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และนายแสนชัย นารี นิสิตปริญญาตรี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ช่วยให้ความรู้ แนะแนวทาง อำนวยความสะดวกในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย

ขอขอบพระคุณ นางสาวสุรีย์พร เรืองแสงทองกุล และนางสาวธิวรรณ แก่นจันทร์ นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ช่วยให้ความรู้ แนะแนวทาง อำนวยความสะดวกในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อจัด แดงจิระ คุณแม่ผล แดงจิระ และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนข้าพเจ้าเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

สุรางค์รัตน์ แดงจิระ

54990033: สาขาวิชา: เคมีศึกษา; วท.ม. (เคมีศึกษา)
คำสำคัญ: บอนหอม/ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ/ ฤทธิ์ทางชีวภาพ/ การวิเคราะห์ด้วย GC/MS

สุรางค์รัตน์ แดงจิระ: องค์ประกอบทางเคมี การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของบอนหอม (CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF *HOMOLOMENA ROSTRATA* GRIFF.)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จเร จรัสจรูญพงศ์, Ph.D. 145 หน้า. ปี พ.ศ. 2558.

บอนหอม (*Homalomena rostrata* Griff.) เป็นพืชวงศ์บอน (วงศ์ ARACEAE) พบในป่าเขตพื้นที่ตำบลเมืองลี อำเภอนาหมื่น จังหวัดน่าน ประเทศไทย บอนหอมจัดเป็นพืชที่พบน้ำมันหอมระเหยได้ทุกส่วนของต้น โดยลำต้นและใบมักนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารบางชนิด ส่วนรากและเหง้ามีการนำไปใช้เป็นส่วนผสมของยาสมุนไพร งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดบอนหอม และวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี GC/MS จากการศึกษาพบว่า สารสกัดบอนหอมมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยสารสกัดบอนหอมส่วนเหง้าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (CRH) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาคือ สารสกัดบอนหอมส่วนใบที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ (AL) และสารสกัดบอนหอมส่วนต้นที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (CS) โดยมีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 28.39±0.0001, 23.76±0.0002 และ 1.85±0.0001 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Agar Disc Diffusion ของสารสกัดบอนหอม พบว่า สารสกัดบอนหอมที่กลั่นด้วยน้ำ ส่วนราก (AR), เหง้า (ARH), ลำต้น (AS), ใบ (AL) และสารสกัดบอนหอมส่วนเหง้าที่กลั่นแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายเอทานอล (BRH1) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus cereus* และยังพบว่าสารสกัดจากใบบอนหอม (AL) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* สารสกัดบอนหอมทุกชนิดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดนี้ ซึ่งจากสารสกัดบอนหอมทั้งหมด สารสกัดบอนหอมส่วนใบ (AL) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดบอนหอมส่วนใบ (AL) ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี (GC/MS) พบองค์ประกอบทางเคมีทั้งหมด 52 ชนิด องค์ประกอบหลักเป็นสารที่ไม่ทราบโครงสร้าง (Unknown compound) มีปริมาณถึง 63% และพบองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 4 ชนิด คือ Palmitic acid (3.79 %), 4-vinylguaiacol (1.34 %), 4-Vinylphenol (1.09 %) และ Phytol (0.84%) ตามลำดับ

54990033: MAJOR: CHEMICAL EDUCATION; M.Sc. (CHEMICAL EDUCATION)

KEYWORDS: *HOMALOMENA ROSTRATA* (GRIFF.)/ ANTIOXIDANT/ ANTIBACTERIAL ACTIVITY/ ESSENTIAL OILS/ GC-MS ANALYSIS

SURANGRAT DEANGCHIRA: CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF *HOMALOMENA ROSTRATA* (GRIFF.) ADVISORY COMMITTEE: JARAY JARATJAROONPHONG, Ph.D. 145 P. 2015.

Homalomena rostrata (Griff.) is one of the Araceae family that found in the Muanglee forest, Namuen district, Nan, Thailand. This plant is rich source of essential oils. Fresh stem and leaves of the plant are used in certain food preparation. Roots and rhizomes have been used as herbal medicine. This research aims to study the effect of antioxidant and antibacterial activities of *H. rostrata* (Griff.) extracts. The phytochemical constituents of *H. rostrata* (Griff.) extracts were also studied by GC/MS analysis. Initially, the antioxidant activity were evaluated and the rhizomes extract (CRH) was found to be most antioxidant activities followed by the leaves extract (AL) and the stem extract (CS) (%DPPH inhibition = 28.39±0.0001, 23.76±0.0002 and 1.85±0.0001 μg/mL) respectively. Furthermore, the extracts were also assayed their anti-bacterial activities by the agar disc diffusion method. It was found that, the roots extract (AR), rhizomes extracts (ARH), stem extracts (AS), leaves extracts (AL) and ethanolic soxhlet extracts of rhizomes (BRH1) exhibited moderate inhibitory effect on the growth of *Bacillus cereus*. Gratifyingly, the leaves extract (AL) showed potent inhibitor of *stephylococcos aureus* growth. However, no extracts inhibited the growth of gram negative bacteria; *Escherichia coli.* Among all extracts of *H. rostrata* (Griff.), the leaves extract (AL) showed the most inhibition on the growth of bacterial strains tested. The GC/MS analysis of the leaves extract (AL) was then carried out and the results showed the presence of 52 phytochemicals. The major component is the unknown compound in 63%. Moreover, there are the four anti-oxidative agents such as palmitic acid (3.79 %), 4-vinylguaiacol (1.34 %), 4-vinylphenol (1.09 %) and phytol (0.84%) in the GC/MS analysis.

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 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	3
1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ	3
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ข้อมูลพืชสมุนไพร	4
2.2 น้ำมันหอมระเหย	5
2.3 การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร	6
2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	9
2.5 อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ	12
2.6 เทคนิคแอบซอบชันสเปกโตรสโกปี	17
2.7 เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเน่าเสีย	19
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	25
3. วิธีดำเนินการวิจัย	36
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี	36
3.2 วิธีการวิจัย	38

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4. ผลการวิจัยและอภิปรายผล	46
4.1 สารสกัดจากส่วนราก เหง้า ลำต้น และใบบอนหอม	46
4.2 การหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดบอนหอม	48
4.3 การทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ	57
4.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	61
4.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS	63
5. สรุปผลการทดลอง	69
5.1 ข้อเสนอแนะ	70
บรรณานุกรม	72
ภาคผนวก	75
ภาคผนวก ก	76
ภาคผนวก ข	81
ภาคผนวก ค	84
ภาคผนวก ง	88
ภาคผนวก จ	92
ภาคผนวก ฉ	98
ภาคผนวก ช	104
ภาคผนวก ซ	107
ภาคผนวก ฌ	119
ภาคผนวก ญ	123
ประวัติย่อของผู้วิจัย	145

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2-1 ตารางแสดงความมีขั้วของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ 9

2-2 ตารางแสดงองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยจาก *Homalomena sagittifolia* Jungh..... 28

2-3 ตารางแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Homalomena aromatic* 33

4-1 ลักษณะและปริมาณที่สกัดได้ (Yield) ของส่วนสกัดบอนหอม........ 47

4-2 ค่า R_f ระบบตัวทำละลาย ของสารสกัดบอนหอมที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ 48

4-3 ค่า R_f ระบบตัวทำละลาย ของสารสกัดบอนหอมที่สกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายเอทานอล 49

4-4 ค่า R_f ระบบตัวทำละลาย ของสารสกัดบอนหอมที่สกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายเฮกเซน 49

4-5 ค่า R_f ระบบตัวทำละลาย ของสารสกัดบอนหอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล.......... 50

4-6 ค่า R_f ระบบตัวทำละลาย ของสารสกัดบอนหอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 51

4-7 ผลการทดสอบกลุ่มสารต่าง ๆ และการต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดบอนหอมด้วยวิธีโครมาโทรกราฟฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC) 53

4-8 ค่า R_f ของการทดสอบกลุ่มสารต่าง ๆ และการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดบอนหอม . 54

4-9 ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดบอนหอม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ........ 58

4-10 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดบอนหอม........ 62

4-11 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดบอนหอม (AL) ด้วย GC/MS 64

\

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ต้นบอนหอม	4
2-2	เครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหยแบบกลั่นด้วยน้ำ	6
2-3	เครื่องสกัดแบบซอกห์เลต	7
2-4	แก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี	11
2-5	การจับกับโลหะของสารต้านอนุมูลอิสระ	14
2-6	Diphenylpicrylhydrazyl (free radical)	16
2-7	Diphenylpicrylhydrazyl (non radical)	16
2-8	หลักการวิเคราะห์สารโดยเทคนิคแอบซอบชันสเปกโตรสโกปี	18
2-9	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและการใช้ประโยชน์เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง	19
2-10	สูตรโครงสร้างของ neointermedeol	31
3-1	แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย	38
3-2	แผนผังแสดงการ Partition สารสกัดหยาบเอทานอล (ส่วนเหง้า)	41
4-1	ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดบอนหอม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	59
4-2	ภาพแสดงตัวอย่างการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ATCC 11778	61
ก-1	ต้นบอนหอม	77
ก-2	ต้นบอนหอม	77
ก-3	ต้นบอนหอม	77
ก-4	รากและเหง้าบอนหอม	78
ก-5	รากและเหง้าบอนหอม	78
ก-6	เหง้าบอนหอม	79
ก-7	ลำต้นบอนหอม	79
ก-8	ใบบอนหอม (หน้าใบ)	80
ก-9	ใบบอนหอม (หลังใบ)	80
ข-1	การสกัดบอนหอมด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ	82
ข-2	การสกัดบอนหอมด้วยวิธีซอกห์เลต	82
ข-3	การสกัดบอนหอมส่วนลำต้นด้วยตัวทำละลายเอทานอล	83

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

ข-4 การสกัดบอนหอมส่วนเหง้าด้วยตัวทำละลายเอทานอล.. 83

ค-1 การทดสอบ TLC หาระบบการแยกสารสกัดบอนหอมด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ 85

ค-2 การทดสอบ TLC หาระบบการแยกสารสกัดบอนหอมแบบซอกห์เลต ด้วยตัวทำละลาย เอทานอล 86

ค-3 การทดสอบ TLC หาระบบการแยกสารสกัดบอนหอมแบบซอกห์เลต ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน 87

ง-1 การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดบอนหอม โดยเทคนิค TLC ………………... 89

ง-2 การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดบอนหอมโดยเทคนิค TLC……………………90

ง-3 การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดบอนหอมโดยเทคนิค TLC……………………91

ฉ-1 โครมาโทแกรมของสารสกัดบอนหอมส่วยใบที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ (AL) จากการวิเคราะห์ด้วย GC/MS.. 99

ฉ-2 โครมาโทแกรมของสารสกัดบอนหอมส่วนใบที่กลั่นด้วยน้ำ (AL) ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched : Wiley7N edition, Retention Time 20.46 minute, Quality: 86 %, Total: 1.09 %, ID: 4-Vinylphenol.. 100

ฉ-3 โครมาโทแกรมของสารสกัดบอนหอมส่วนใบที่กลั่นด้วยน้ำ (AL) ที่ได้จากเครื่อง GC/M เทียบกับ Library Searched : Wiley7N edition, Retention Time 23.18 minute, Quality: 96 %, Total: 1.34 %, ID: 4-vinylguaiacol... 101

ฉ-4 โครมาโทแกรมของสารสกัดบอนหอมส่วนใบที่กลั่นด้วยน้ำ (AL) ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched : Wiley7N edition, Retention Time 43.31 minute, Quality: 99 %, Total: 3.79 %, ID: Palmitic acid 102

ฉ-5 โครมาโทแกรมของสารสกัดบอนหอมส่วนใบที่กลั่นด้วยน้ำ (AL) ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched : Wiley7N edition, Retention Time 46.27 minute, Quality: 96 %, Total: 0.84 %, ID: Phytol... 103

ช-1 กราฟสมการในการคำนวณ IC_{50} ของสารมาตรฐาน Ascorbic acid.................................. 105

ช-2 กราฟสมการในการคำนวณ IC_{50} ของสารมาตรฐาน Gallic acid....................................... 106

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

ซ-1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร AR, ARH ในการต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 108
ซ-2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร AS, AL ในการต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 108
ซ-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BR1, BRH 1 ในการต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 109
ซ-4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BS1, BL1 ในการต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 109
ซ-5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BR2, BRH2 ในการต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 110
ซ-6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BS2, BL2 ในการต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 110
ซ-7 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร CRH, CS ในการต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 111
ซ-8 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร AR, ARH ในการต้านการเจริญของ *Bacillus cereus* ATCC 11778 111
ซ-9 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร AS, AL ในการต้านการเจริญของ *Bacillus cereus* ATCC 11778 112
ซ-10 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BR1, BRH 1 ในการต้านการเจริญของ *Bacillus cereus* ATCC 11778 112
ซ-11 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BS1, BL1 ในการต้านการเจริญของ *Bacillus cereus* ATCC 11778 113
ซ-12 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BR2, BRH2 ในการต้านการเจริญของ *Bacillus cereus* ATCC 11778 113

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

ซ-13 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BS2, BL2 ในการต้านการเจริญของ *Bacillus cereus* ATCC 11778 114
ซ-14 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร CRH, CS ในการต้านการเจริญของ *Bacillus cereus* ATCC 11778 114
ซ-15 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร AR, ARH ในการต้านการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922... 115
ซ-16 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร AS, AL ในการต้านการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922... 115
ซ-17 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BR1, BRH 1 ในการต้านการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922... 116
ซ-18 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BS1, BL1 ในการต้านการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922... 116
ซ-19 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BR2, BRH2 ในการต้านการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922... 117
ซ-20 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BS2, BL2 ในการต้านการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922... 117
ซ-21 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร CRH, CS ในการต้านการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922... 118
ญ-1 แผนผังแสดงการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตตรอน 125
ญ-2 ผลการทดสอบ TLC ของสารสกัดที่แยก fraction.. 127
ญ-3 โครมาโทแกรมสารสกัดบอนหอม (AL), f11-24 จากการวิเคราะห์ ^{1}H-NMR............... 131
ญ-4 โครมาโทแกรมสารสกัดบอนหอม (AL), f11-24 จากการวิเคราะห์ ^{13}C-NMR.............. 132
ญ-5 โครมาโทแกรมสารสกัดบอนหอม (AL), f6 จากการวิเคราะห์ ^{1}H-NMR....................... 133
ญ-6 โครมาโทแกรมสารสกัดบอนหอม (AL), f7 จากการวิเคราะห์ ^{1}H-NMR....................... 134
ญ-7 โครมาโทแกรมสารสกัดบอนหอม (AL), f1 จากการวิเคราะห์ ^{1}H-NMR....................... 135
ญ-8 โครมาโทแกรมสารสกัดบอนหอม (AL), f5 จากการวิเคราะห์ ^{1}H-NMR....................... 136
ญ-9 โครมาโทแกรมสารสกัดบอนหอม (AL), f9 จากการวิเคราะห์ ^{1}H-NMR....................... 137

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

ญ-10 โครมาโทแกรมสารสกัดบอนหอม (AL), f15 จากการวิเคราะห์ ^{1}H-NMR 139

ญ-11 โครมาโทแกรมสารสกัดบอนหอม (AL), f25 จากการวิเคราะห์ ^{13}C-NMR 140

ญ-12 โครมาโทแกรมสารสกัดบอนหอม (AL), f28 จากการวิเคราะห์ ^{1}H-NMR 141

ญ-13 โครมาโทแกรมสารสกัดบอนหอม (AL), f29 จากการวิเคราะห์ ^{1}H-NMR 142

ญ-14 โครมาโทแกรมสารสกัดบอนหอม (AS) จากการวิเคราะห์ ^{1}H-NMR 143

ญ-15 โครมาโทแกรมสารสกัดบอนหอม (AR) จากการวิเคราะห์ ^{1}H-NMR 144

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยพืชผักนานาชนิด มีความแตกต่างกันไปในแต่ละเขตพื้นที่ ตามลักษณะภูมิอากาศ ลักษณะภูมิประเทศ และสิ่งที่น่าสนใจ คือ พืชผักพื้นบ้านในแต่ละท้องถิ่นที่มีคุณสมบัติเป็นเอกลักษณ์ของตนเอง ถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในการประกอบอาหาร เป็นเครื่องเทศเพื่อปรุงแต่ง สี กลิ่น รส และเป็นส่วนประกอบในยาสมุนไพรพื้นบ้าน ดังนั้นแนวทางในการเลือกรับประทานผัก จึงเป็นสิ่งที่ทั่วโลกให้ความสนใจและตระหนักถึงความสำคัญโดยเฉพาะพืชผักสมุนไพรพื้นบ้าน เป็นแนวทางหนึ่งที่ผู้บริโภคนิยมเลือกนำมาบริโภคเป็นอาหาร นำมาใช้ดูแล บำรุง รักษา ป้องกันสุขภาพร่างกาย และที่สำคัญในด้านการส่งเสริมความสวยงามของร่างกาย ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะสิ่งแวดล้อมในสังคมปัจจุบัน ที่พบว่ามีปัญหาด้านมลพิษต่าง ๆ อยู่รอบ ๆ ตัวเรา อันเป็นสาเหตุของการเกิดโรคภัยไข้เจ็บ ร่างกายไม่สร้างภูมิคุ้มกัน ซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคภัยต่าง ๆ การเสื่อมสภาพของเซลล์ จึงมีการทดลองวิจัยทางวิทยาศาสตร์และได้พิสูจน์ว่า สารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งพบได้ในอาหาร พืช ผัก และผลไม้มีบทบาทสำคัญในการลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคต่าง ๆ เรียกได้ว่าเป็นสารที่สามารถลด ชะลอ หรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา ไม่ทำลายสารชีวโมเลกุลในร่างกาย (โอภา วัชระคุปต์, 2549) จากปัญหาเรื่องโรคภัยไข้เจ็บนี้ ทำให้มนุษย์มีความใส่ใจดูแลสุขภาพร่างกายมากยิ่งขึ้น

ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าสังคมปัจจุบันได้มีการศึกษาการสกัดสารสมุนไพร ที่มีสรรพคุณต่าง ๆ นำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากขึ้น เช่น ด้านอุตสาหกรรมอาหาร ยารักษาโรค และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เป็นต้น กลิ่นหอมจากน้ำมันหอมระเหยของพืชสมุนไพรที่มีในพืชแต่ละชนิด จะมีประโยชน์ในการนำมาช่วยบำบัดอาการผิดปกติต่าง ๆได้ดี โดยกลิ่นจะช่วยกระตุ้นให้สารร่างกายหลั่งสารเอ็นโดฟีนที่ช่วยลดความเจ็บปวด สารเอนเซปฟาลีนที่ทำให้มีอารมณ์ดี และสารเซโรโทนินที่ช่วยให้ร่างกายรู้สึกสงบเยือกเย็นและผ่อนคลายลงได้ เป็นต้น และเนื่องจากในน้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย และไวรัสบางชนิด มีฤทธิ์เป็นยากระตุ้นหรือเป็นยานอนหลับ กลิ่นหอมจึงถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน (อรัญญา มโนสร้อย และจีรเดช มโนสร้อย, 2548)

บอนหอม เป็นพืชวงศ์บอน (วงศ์ ARACEAE) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Homalomena rostrata* Griff. และมีชื่อพ้องคือ *Homalomena sagittifolia* Jungh. เป็นพืชพื้นบ้านของภาคใต้และภาคตะวันออกเป็นส่วนใหญ่ และพบในภาคเหนือบริเวณที่ชื้น ๆ ในป่าทั่วไป มีกลิ่นหอมทุกส่วนของต้นบอนหอม สรรพคุณรักษาอาการไอ ขับเสมหะ แก้ไข้ ช่วยให้กระเพาะอาหารพองตัว (เต็ม สมิตินันทน์, 2523) ในเขตพื้นที่ตำบลเมืองลี อำเภอนาหมื่น จังหวัดน่าน ชาวบ้านนิยมนำพืชบอนหอมมารับประทาน โดยนิยมนำส่วนใบและลำต้นไปปรุงรสเป็นส่วนประกอบของอาหารพื้นเมือง เช่น แกงห้วย แกงส้ม แกงยอดตาว (ต้นลูกชิด) แกงหน่อหวาย เป็นต้น ซึ่งช่วยให้รสชาติอาหารดี มีกลิ่นหอมน่ารับประทาน อีกทั้งหมอชาวบ้านตำราแพทย์สมุนไพร ได้นำเหง้าของบอนหอมไปเป็นส่วนผสมในการปรุงยาสมุนไพรพื้นเมือง มีงานวิจัยที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากบอนหอม (Wong, Lim, & Ali, 2006) แต่ยังไม่พบว่ามีรายงานวิจัยใด ที่ทำการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย ทั้งฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพ

ด้วยบอนหอมเป็นพืชพื้นบ้านที่นิยมนำมารับประทานในชีวิตประจำวันและใช้ประโยชน์ด้านยารักษาโรคตามภูมิปัญญาชาวบ้าน อีกทั้งบอนหอมเป็นพืชที่มีกลิ่นหอม มีความเป็นไปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยจากบอนหอมน่าจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญที่จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ต่อไปได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีน้ำมันหอมระเหยจากส่วนต่าง ๆ ของบอนหอม ได้แก่ ส่วนราก เหง้า ลำต้น และใบ ที่พบในเขตพื้นที่ตำบลเมืองลี อำเภอนาหมื่น จังหวัดน่าน โดยใช้วิธีการสกัดสารจากบอนหอมด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ สกัดแบบซอกห์เลต สกัดด้วยตัวทำละลาย พร้อมทั้งทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพทางการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เพื่อการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อสกัดน้ำมันหอมระเหยจากส่วนราก เหง้า ลำต้น และใบของบอนหอม ด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ การสกัดแบบซอกห์เลต และสกัดด้วยตัวทำละลาย
2. เพื่อศึกษาการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทางการต้านเชื้อแบคทีเรีย จากจากส่วนสกัดราก เหง้า ลำต้นและใบของบอนหอม
3. เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากส่วนราก เหง้า ลำต้น และใบของบอนหอม ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี (GC/MS)

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาการสกัดสารสกัดบอนหอมจากส่วนราก เหง้า ลำต้น และใบ ที่เก็บจากป่าในเขตตำบลเมืองลี อำเภอนาหมื่น จังหวัดน่าน โดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ การสกัดแบบซอกห์เลต และสกัดด้วยตัวทำละลาย

2. ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH assay) จากการทดสอบเชิงคุณภาพ ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) และเลือกส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการทดสอบเชิงคุณภาพมาทดสอบเชิงปริมาณ ด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี

3. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ด้วยวิธี Agar Disc Diffusion

4. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดจากบอนหอม ที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุด ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี (GC/MS)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ทำให้ทราบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดบอนหอม

2. ทำให้ทราบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดบอนหอม

3. เป็นแนวทางในการพัฒนาด้านการศึกษาสารเคมีที่สำคัญของพืชชนิดอื่น ๆ ต่อไป

4. เป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตยา เครื่องสำอาง เป็นต้น

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

1. องค์ประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพร หมายถึง สารอินทรีย์ที่มีในพวกพืชสมุนไพรบางชนิด ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน และมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

2. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดบอนหอม หมายถึง สมบัติในการยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical) ของสารสกัดบอนหอม

3. IC_{50} (Inhibition Concentrate) หมายถึง ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งไม่ให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50

4. GC/MS คือ เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อนำมาประกอบการดำเนินการตามลำดับดังนี้

2.1 ข้อมูลพืชสมุนไพร

2.2 น้ำมันหอมระเหย

2.3 การสกัดแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพร

2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

2.5 อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ

2.6 เทคนิคแอบซอบชันสเปกโตรสโกปี

2.7 เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหารและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดจากสมุนไพร

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลพืชสมุนไพร

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของบอนหอม (เต็ม สมิตินันท์, 2523)

บอนหอม เป็นพืชวงศ์บอน (วงศ์ ARACEAE) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Homalomena rostrata* Griff. และมีชื่อพ้องคือ *Homalomena sagittifolia* Jungh. มีชื่อเรียกอื่น ๆ ว่า กลาดีมาแซ้ (มลายู, นราธิวาส, มาเลย์), บอนส้ม (ภาคใต้), บอนหอม (ภาคเหนือ, แพร่, น่าน) บอนหอมเป็นพืชล้มลุก ขยายพันธุ์โดยวิธีการแยกหัว มักขยายพันธุ์ในช่วงฤดูฝน สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต มักจะพบขึ้นตามที่ชื้นทั่วไป พบได้ตลอดทั้งปี ดังภาพที่ 2-1 ต้นบอนหอม

ภาพที่ 2-1 ต้นบอนหอม (อ้างอิงจาก http://www.bansuanporpeang.com/node/5617 สืบค้นวันที่ 28 มีนาคม 2557)

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

บอนหอมเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นก้านหุ้มคล้ายบอน แต่มีขนาดเล็กกว่า มีความยาวประมาณ 5-7.5 เซนติเมตร ใบเป็นรูปขอบขนานหรือรูปหอกกลับ ใบจะเรียวแหลม ริมขอบใบจะเรียว ส่วนตรงโคนใบจะกลมแคบ มีความยาวประมาณ 15-60 เซนติเมตร กว้างประมาณ 60 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อเป็นแท่งกลมยาว ดอกตัวเมียนั้นจะอยู่ตอนล่างถัดจากดอกตัวผู้ แต่จะมีจำนวนน้อยกว่าตัวผู้หรืออาจจะมีดอกไม่มีเพศคั่นอยู่ระหว่างกลาง ก้านช่อดอกยาวดอกอ่อนจะมีสีขาว เมื่อแก่จะมีสีเขียว มีกาบหุ้ม ช่อดอกยาวประมาณ 12.5-15 เซนติเมตร กาบจะป่องออกมาตรงช่วงที่เป็นดอกเพศเมีย ตรงปลายของมันจะเป็นรูปจะงอย ส่วนตรงกลางจะขอดและตอนบนแคบ

2.1.3 ประโยชน์

การนำบอนหอมไปใช้ประโยชน์ พบว่ามีการนำช่อดอก ยอดอ่อน ก้านใบ ลอกเปลือกออกนำไปปรุงอาหาร เช่น แกงส้ม แกงเลียง หลามบอน แกงห้วย แกงยอดตาว แกงหน่อหวาย และสรรพคุณทางยาใช้รักษาอาการไอ ขับเสมหะ แก้ไข้และช่วยให้กระเพาะอาหารพองตัว

2.2 น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย (Essential oils) หรือน้ำมันที่ระเหยง่าย (Volatile oil) คือ สารประกอบที่มีกลิ่นหอม ระเหยง่าย เป็นของเหลวใสไม่มีสี หรือมีสีเหลืองอ่อน เป็นสารที่ได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ดอก ใบ กลีบเลี้ยง เมล็ด เนื้อและเปลือกไม้ ลำต้น ราก และเหง้า เมื่อถูกความร้อนอนุภาคเล็ก ๆ ของน้ำมันหอมเหล่านี้จะระเหยออกมาเป็นกลุ่มไอรอบ ๆ ทำให้ได้กลิ่นหอม ซึ่งในธรรมชาติน้ำมันหอมระเหยจะช่วยดึงดูดแมลงให้มาผสมเกสรดอกไม้ ช่วยรักษาความชุ่มชื้นแก่พืช และช่วยป้องกันศัตรู (อรัญญา มโนสร้อย และจีรเดช มโนสร้อย, 2548)

ปัจจุบันมนุษย์ได้นำน้ำมันหอมระเหยมาใช้ประโยชน์มากมาย เช่นใช้แต่งกลิ่นอาหาร ได้แก่ ลูกกวาด เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์นม ใช้ในอุตสาหกรรมน้ำหอม เช่น น้ำมันกุหลาบ น้ำมันมะลิ น้ำมันกระดังงา ใช้ในอุตสาหกรรมยา เช่น น้ำมันกานพลู ซึ่งสามารถใช้ฆ่าเชื้อโรคได้ จึงมีการนำมาใช้ผสมในน้ำยาบ้วนปาก น้ำมันยูคาลิปตัส ใช้แก้หวัด น้ำมันไพล ใช้แก้อาการปวดบวมและฟกช้ำ น้ำมันเปปเปอร์มินท์ ใช้ขับลมและแต่งกลิ่นยา ใช้ในด้านสุคนธบำบัด เช่น น้ำมันกระดังงา น้ำมันลาเวนเดอร์ น้ำมันคาโมมายล์ น้ำมันโหระพาช่วยให้สงบและผ่อนคลาย และน้ำมันมะนาว น้ำมันยูคาลิปตัสและ น้ำมันเปปเปอร์มินต์ ทำให้รู้สึกสดชื่นกระปรี้กระเปร่า อีกทั้งนิยมนำมาใช้ไล่แมลง เป็นต้น

2.3 การสกัดแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพร

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปในการสกัดสารเบื้องต้น ไม่ว่าจะสกัดด้วยวิธีการใดหรือใช้ตัวทำละลายใด ก็จะได้องค์ประกอบเป็นของผสมหรือสารสกัดอย่างหยาบ (Crude extract) ซึ่งเป็นสิ่งที่สกัดออกมาจากสมุนไพรโดยใช้ตัวทำละลาย สารสกัดอย่างหยาบเป็นของผสมขององค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพร ซึ่งมีทั้งองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เรียกว่า สารสำคัญ และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เรียกว่า สารเฉื่อย ชนิดและสัดส่วนขององค์ประกอบในสารสกัดจะเปลี่ยนไปตามสภาพของสมุนไพรที่ใช้และสภาวะที่ใช้ในการสกัด สำหรับการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยทำการสกัดสารด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ การสกัดแบบซอกห์เลต และสกัดด้วยตัวทำละลาย ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

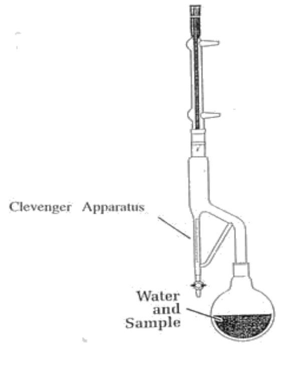
2.3.1 การสกัดโดยการกลั่นด้วยน้ำ (Hydrodistillation)

การกลั่นด้วยน้ำ เป็นเทคนิคการสกัดที่ใช้กับพืชสด จะแยกสารที่สามารถระเหยง่ายออกจากสารที่ระเหยยาก โดยมีหลักการ คือนำสารไปต้มรวมน้ำ เมื่อมีความร้อนสารที่ต้องการสกัดแยกและน้ำจะระเหย ออกมาพร้อมกัน จนกระทั่งความดันไอของสารรวมกับความดันไอน้ำเท่ากับความดันบรรยากาศ น้ำมันหอมระเหยจะถูกพาออกมาในลักษณะที่รวมกับไอน้ำและจะถูกส่งผ่านเข้าไปสู่ขั้นตอนการควบแน่นให้เป็นของเหลว จึงทำให้เกิดแยกชั้นชัดเจนระหว่างน้ำและน้ำมันหอมระเหย ทำให้แยกออกมาได้สะดวก โดยแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นน้ำอยู่ชั้นล่างและสารที่ต้องการสกัดอยู่ขึ้นบน

สมบัติของสารที่แยกโดยการกลั่นด้วยน้ำ

1. ต้องไม่ละลายน้ำ จึงจะสามารถแยกออกจากน้ำได้ง่าย โดยใช้กรวยแยก

2. มีสมบัติระเหยง่าย มีจุดเดือดสูงหรือต่ำกว่าน้ำ ถ้าสารมีจุดเดือดต่ำจะแยกได้ดีกว่าสารที่มีจุดเดือดสูง



ภาพที่ 2-2 เครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหยแบบกลั่นด้วยน้ำ (อ้างอิงจาก http://www.tistr.or.th/pharma/Essen_ext.htm สืบค้นวันที่ 28 มีนาคม 2557)

2.3.2 การสกัดแบบซอกห์เลต (Soxhlet extraction)

การสกัดแบบซอกห์เลต เป็นเทคนิคการแยกสารที่ใช้ทำละลายในปริมาณน้อย เนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารแล้วจะถูกทำให้ระเหยและควบแน่นกลับมาเมื่อเจอกับระบบหล่อเย็นทำให้สกัดได้อีกเป็นลักษณะหมุนเวียน โดยตัวทำละลายที่ใส่ลงไปในเครื่องมือ จะหมุนเวียนผ่านสารที่เราต้องการสกัดหลาย ๆ ครั้ง เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด จนกระทั่งสารที่เราต้องการสกัดออกมามีปริมาณเข้มข้นมากพอ

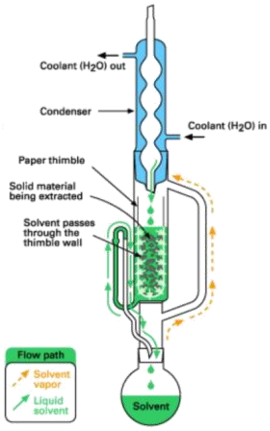
ตัวแปรที่มีผลต่อการสกัด

1. ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดสาร ต้องเหมาะสมกับการสกัดสารที่สนใจสกัด โดยอาศัยหลักการ Like dissolve like

2. ปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้สกัด ปริมาตรตัวทำละลายต้องมีมากพอ คือเมื่อตัวทำละลายส่วนหนึ่งเกิดการระเหยขึ้นไปสกัดสารก่อนที่จะเต็ม Refluxsidearm จากนั้นจะเป็นแบบลักษณะของกาลักน้ำต่อไป ในส่วนของ Flask ก็จะต้องมีตัวทำละลายเหลืออยู่ เพื่อทำให้การสกัดเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา ซึ่งตัวทำละลายที่มากเกินพอ สามารถระเหยออกได้เมื่อสกัดสารที่สนใจได้ตามที่ต้องการ ด้วยเครื่อง Rotary evaporator

3. เวลาที่ใช้สกัด เวลาที่ใช้สกัดต้องมีความเหมาะสม ที่จะสามารถสกัดเอาสารที่สนใจออกจากตัวอย่างให้ได้มากที่สุด ซึ่งในเทคนิคนี้ส่วนใหญ่เวลาที่ใช้สกัดมักจะยาวนานเป็นชั่วโมง เพื่อให้เกิดการ reflux ของตัวทำละลายหลาย ๆ ซ้ำ ทำให้สารที่ถูกสกัดออกจากตัวอย่างได้มากที่สุด

4. ตัวอย่างที่ใช้ในเทคนิคนี้ตัวอย่างมักจะเป็นของแข็ง ดังนั้น ต้องทำตัวอย่างให้มีพื้นผิวสัมผัสกับสารมากที่สุด คือพยายาม สับ หรือ หั่น ให้ตัวอย่าง มีขนาดเล็กที่สุด เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัส



ภาพที่ 2-3 เครื่องสกัดแบบซอกห์เลต (อ้างอิงจาก http://www.cremonaviolintools.com/index.php สืบค้นวันที่ 28 มีนาคม 2557)

2.3.3 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

การสกัดด้วยตัวทำละลาย ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล ปิโตรเลียมอีเทอร์ หรือเฮกเซน ซึ่งการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีนี้จะใช้กับพืชที่ไม่สามารถสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีการกลั่นไอน้ำได้

วิธีนี้เป็นการสกัดสาระสำคัญจากพืช โดยการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลาย จนกระทั่งเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่ม และตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมาได้ โดยการหมักสมุนไพรควรทำในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท ในการสกัดจะใช้เวลานาน 7 วัน หรือตามกำหนดในเภสัช เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรองแยกกากออกจากตัวทำละลาย การสกัดแบบนี้เหมาะสมกับพืชสมุนไพรที่มีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อที่ไม่แข็งแรงมากนัก เช่นใบ ดอก ซึ่งทำให้อ่อนนุ่มได้ง่าย จัดเป็นวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายปริมาณน้อย จึงเป็นวิธีการที่ประหยัดและคุ้มค่า

การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม

ในการสกัดสารสำคัญจากพืช จะต้องเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการจะแยก ซึ่งมีหลักที่ควรพิจารณาในการเลือกตัวทำละลาย ดังต่อไปนี้

1. คุณสมบัติของสารที่ต้องการสกัด เช่น ความมีขั้วของสาร ความคงตัวของสารในตัวทำละลายนั้นในอุณหภูมิสูง
2. มีความสามารถในการละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี
3. ไม่ละลายปนเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายของสารผสมที่ถูกสกัดนั้น
4. ไม่ควรละลายสิ่งเจือปนหรือสารที่ไม่ต้องการ
5. สามารถแยกออกจากตัวถูกละลายได้ง่ายภายหลังที่สกัดแล้ว
6. ไม่ควรทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด
7. ตัวทำละลายควรมีราคาไม่แพงมาก

ความมีขั้วของตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัดสาร แสดงดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 แสดงความมีขั้วของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

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

2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

2.4.1 โครมาโทกราฟี (Chromatography) เป็นวิธีการแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ออกจากกันที่ได้ผลดีมากและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยอาศัยความแตกต่างการกระจายตัวของสารตัวอย่างระหว่าง 2 เฟส ที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ซึ่งอาจเป็นของเหลวหรืออาจเป็นแก๊ส กับอีกเฟสหนึ่งซึ่งเป็นเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) หรือของเหลวที่ล้อมรอบวัสดุช่วยพยุง ซึ่งทำหน้าที่ในการแยกสารหรือองค์ประกอบของสารออกจากกัน ขึ้นอยู่กับความจำเพาะเจาะจงของสารตัวอย่างที่มีต่อเฟสอยู่กับที่ ประโยชน์ของการทำโครมาโทกราฟี คือ 1) ใช้แยกสารแต่ละชนิดออกจากสารผสม 2) ตรวจความสม่ำเสมอของสารตัวอย่าง 3) ทำสารให้บริสุทธิ์ 4) ตรวจเอกลักษณ์ของสาร 5) ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ 6) ตรวจสารปนเปื้อน

2.4.1.1 ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกและตรวจสอบสารปริมาณน้อย ๆ โดยใช้เฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) ส่วนใหญ่นิยมใช้สารที่เป็นซิลิกาเจล อลูมินา หรือเซลลูโลส เมื่อหยดสารละลายตัวอย่างซึ่งเป็นสารผสมลงบนแผ่น TLC จากนั้นนำแผ่น TLC ใส่ลงในแท็งก์ซึ่งบรรจุตัวทำละลายซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) หรือระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดกระบวนการที่เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่ไปบนเฟสอยู่กับที่เรียกว่า Development จะเกิดการแยกสารประกอบต่าง ๆ ออกจากกันโดยอาศัยกลไกที่กล่าวมาแล้วข้างต้น อาจมีกลไกมากกว่าหนึ่งกลไก ขึ้นอยู่กับธรรมชาติและคุณสมบัติของเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ แอดซอร์เบนท์ของทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีส่วนใหญ่จะใช้

2.4.1.2 แก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี

หลักการแก๊สโครมาโทกราฟี

แก๊สโครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคที่ใช้แก๊สเฉื่อยทำหน้าที่เป็นแก๊สพา ซึ่งเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่เหมาะที่จะนำมาประยุกต์ใช้แยกสารที่ระเหยง่าย และมีความเสถียรภาพทางความร้อน ในเทคนิคนี้ตัวอย่างจะถูกนำเข้าสู่ระบบและเกิดการระเหยเป็นไอที่จุดฉีดสาร โดยมีการใช้ระบบคอมพิวเตอร์ควบคุม และสื่อสารกับส่วนประกอบต่าง ๆ รับสัญญาณข้อมูลจากดีเทคเตอร์ตลอดจนใช้ประมวลผล และการออกรายงานผลไปที่เครื่องพิมพ์

หลักการแมสสเปกโทรเมตรี

แมสสเปกโทรเมตรี เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบที่ไม่ทราบชนิด และใช้ในการศึกษาโครงสร้างของโมเลกุลได้เป็นอย่างดี โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของมวลที่มีประจุซึ่งหมายถึงไอออนในสนามไฟฟ้าหรือสนามแม่เหล็กพฤติกรรมการเคลื่อนที่ดังกล่าวขึ้นอยู่กับค่ามวลต่อประจุของไอออน นอกจากนี้การทราบประจุของไอออนจะทำให้สามารถทราบค่ามวลของไอออนนั้น ๆ ได้

ภาพที่ 2-4 แก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี
(อ้างอิงจาก http://www.maceducation.com สืบค้นวันที่ 28 มีนาคม 2557)

การวิเคราะห์โดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารตัวอย่าง เป็นเทคนิคร่วมที่ได้รวมข้อดี 2 ประการไว้ด้วยกัน คือ ประการแรก มีความสามารถในการแยกสารผสมซึ่งกลายเป็นไอได้ง่าย ให้ออกเป็นองค์ประกอบเดี่ยว ๆ ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี ซึ่งมีความสามารถในการแยกสูง และอีกประการหนึ่ง คือ องค์ประกอบของสารแต่ละชนิดที่ผ่านการแยกแล้วจะถูกตรวจวัดด้วยวิธีแมสสเปกโทรเมตรี ที่มีความจำเพาะต่อการตรวจวัด มีสภาพไวในการตรวจวัดสูง และให้ข้อมูลแมสสเปกตรัมของสารที่สามารถใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์สารได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เป็นการเชื่อมต่อของสองเทคนิค คือ แก๊สโครมาโทกราฟี ซึ่งเป็นเทคนิคการแยกสารกับแมสสเปกโทรเมตรี ซึ่งเป็นเทคนิคการตรวจวัดที่ใช้ในการพิสูจน์หาเอกลักษณ์และหาปริมาณสาร การรวมกันของสองเทคนิคดังกล่าวนี้ ก่อให้เกิดผลดีหลายประการ ดังนี้

1. ทำให้สามารถแยกองค์ประกอบของสารผสมที่ซับซ้อน
2. ได้แมสสเปกตรัมของแต่ละองค์ประกอบเพื่อประโยชน์ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร
3. สามารถให้ข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณสารแต่ละชนิดที่ผสมกันอยู่
4. มีสภาพไวในการตรวจวัดสารสูง สามารถให้ข้อมูลแมสสเปกตรัมที่สมบูรณ์ถึงแม้ว่าสารมีปริมาณเล็กน้อยเพียง 1 พิโกโมล

5. สามารถให้หลักฐานด้านมวลโมเลกุลของสาร ตลอดจนให้ข้อมูลด้านรูปแบบการแตกของโครงสร้างเป็นส่วนย่อย ๆ ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของสาร เปรียบเสมือนลายพิมพ์นิ้วมือที่สามารถใช้เป็นพื้นฐานในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารได้ (แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ, 2553, หน้า 330 - 332)

2.5 อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ

2.5.1 อนุมูลอิสระ (Free radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลของสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวหรือมากกว่าเนื่องจากการสูญเสียหรือมีเพิ่มขึ้นมาของอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว อาจเป็นประจุลบหรือบวก ซึ่งโดยปกติอิเล็กตรอนจะอยู่เป็นคู่ หากอิเล็กตรอนขาดคู่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยการไปดึงอิเล็กตรอนของสารอื่นมาเป็นคู่หรือให้อิเล็กตรอนแก่สารอื่น เพื่อทำให้อิเล็กตรอนหรือโมเลกุลเสถียร หรือรวมกับโมเลกุลที่ไม่มีอนุมูล กลายเป็นอนุมูลอิสระที่ว่องไวมาก มีอายุสั้นมากประมาณ 1 หรือ 10^{-3}-10^{-10} วินาที เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี โดยสามารถตรวจวัดด้วยเครื่องอิเล็กตรอนสปินเรโซแนนซ์ (Electron Spin Resonance, ESR) โมเลกุลหรืออิออนชนิดนี้เป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ จึงต้องได้รับอิเล็กตรอนจากสารอื่นเพื่อทำให้ตัวเองเกิดการเสถียร (พวงรัตน์ ภักดีโชติ, 2543) อนุมูลอิสระ ถ้าแบ่งตามการเกิดจะแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ อนุมูลอิสระที่เกิดนอกร่างกาย และอนุมูลอิสระที่เกิดในร่างกาย

ตัวอย่างอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายนอกร่างกาย (Wolf, 1998) ได้แก่ สารกลุ่มรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชี่ส์ (Reactive oxygen species, ROS) เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ไอออนแรดิคัล (Superoxide ion radical, $O^{\bullet}_2$) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hidrogenperoxide, H_2O_2) ไฮดรอกซิลเรดิคัล (Hydroxyl radical, $OH^{\bullet}$) ซิงเลตออกซิเจน (Singlet oxygen, O_2) ลิปิดเปอร์รอกซิลเรดิคัล (Lipid peroxyl radical, LOO°) และไนตริกออกไซด์เรดิคัล (Nitric oxide radical, $NO^{\bullet}$)

ตัวอย่างอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย ได้แก่ ปฏิกิริยาของเอนไซม์ Xanthine oxidase ในเนื้อเยื่อสมอง จะเกิดการคะตะไลท์ไปเป็นไฮโปรแซนทิน (Hypoxanthin) จนกระทั่งถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดยูริก (Uric acid) การเกิดไนตริกออกไซด์จากกรดอะมิโนแอล-อาร์จินีน (L-arginine) ได้ $NO^{\bullet}$ จากขบวนการเมตาบอลิซึมของกรดไขมัน Arachidonic acid การทำลายเชื้อโรคภายในร่างกายของระบบภูมิคุ้มกันที่มีเอนไซม์ที่มีชื่อ ไมโครเปอร์รอกซิเดส (Mycloperoxidase) และเอ็นเอดีพีเอช ออกซิเดส (NADPH oxidase) ซึ่งจะสังเคราะห์ไฮโปคลอรัส (Hypochlorus acid) จนกระทั่งได้สารผลิตภัณฑ์ คือ สาร $O^{\bullet}_2$

อนุมูลอิสระ เป็นผลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากการเผาผลาญของร่างกาย โดยการใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมตาบอลิซึมแต่ละครั้งจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีการสูญเสียอิเล็กตรอนหรือมีอิเล็กตรอนเพิ่มขึ้นมาทำให้ไม่เสถียรและพร้อมที่จะทำปฏิกิริยากับสารอื่นอย่างต่อเนื่อง โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับสารประกอบ หรือ Macro molecules เช่น โปรตีน ดีเอ็นเอ ไขมัน และกรดนิวคลีอิก เป็นต้น โดยจะเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ และส่งผลต่อการทำหน้าที่ของเอนไซม์ เป็นผลทำให้เซลล์นั้นถูกทำลาย นำไปสู่การเกิดโรคต่าง ๆ เช่น Malondialdehyde และ 4-OH nonenal ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์และดีเอ็นเอ โดยปกติเมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น ร่างกายจะมีระบบควบคุมหรือป้องกันอนุมูลอิสระตลอดเวลา เรียกว่า ระบบแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidant defense system) โดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระ หรือ สารแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidant) ซึ่งจะทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ หรือแม้กระทั่งป้องกันไม่ให้อนุมูลอิสระไปมีผลทำลายเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกาย

2.5.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคและความชรา จึงมีการป้องกันอันตรายจากสารนี้โดยทดลองใช้สารต้านอนุมูลอิสระในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อชะลอความชรา และการเกิดโรคต่าง ๆ สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามกลไกการยับยั้งได้เป็น 3 ชนิด ดังนี้ 1) Preventive antioxidant ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ 2) Scavenging antioxidant ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น 3) Chain breaking antioxidant ทำให้ลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง

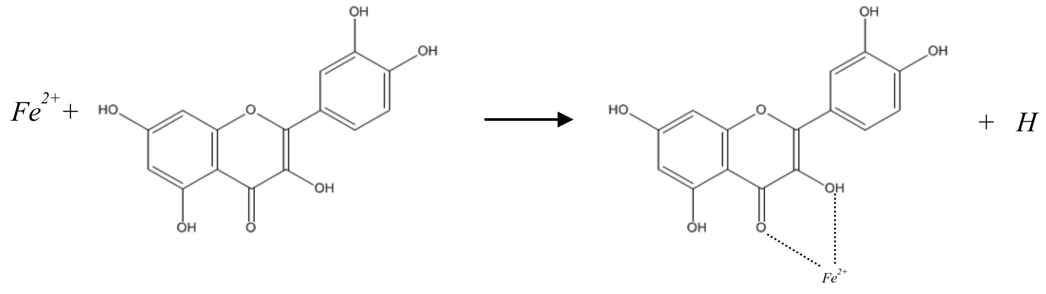
สารต้านอนุมูลอิสระ แบ่งได้เป็นสองกลุ่ม คือกลุ่มที่มีในร่างกายของมนุษย์ได้แก่กลุ่มของเอนไซม์เป็นสิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นมาเพื่อปกป้องตัวเอง และกลุ่มที่ได้รับจากภายนอกร่างกาย กลุ่มของเอนไซม์เป็นสิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นมาเพื่อปกป้องตัวเอง ก็คือระบบต่อต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants system) ซึ่งในร่างกายก็จะมีระบบเอนไซม์ทำให้อนุมูลอิสระเหล่านี้หมดสภาพไป เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase) ซึ่งจะเป็นตัวคะตะเลส(Catalase) สาร $O^{\bullet}_2$ ให้ไปเป็นสาร H_2O_2 และจะมีเอนไซม์กลูตาไธโอน เปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase) และเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) เปลี่ยน H_2O_2 ไปเป็นน้ำ เป็นต้น ดังภาพประกอบ 3 ซึ่งถ้าหากในร่างกายมีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินกว่าที่ระบบต่อต้านอนุมูลอิสระจะจัดการได้ จะเกิดภาวะที่เรียกว่า ออกซิเดทิฟสเตรต (Oxidative stress) ขึ้นมาซึ่งจะส่งผลกระทบต่าง ๆ ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเกิดการทำลายโมเลกุลที่มีพันธะ S-H เยื่อหุ้มเซลล์ และการทำลายเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการแก่ และอาจรุนแรง

ไปถึงการเกิดเป็นโรคภัยไข้เจ็บต่าง ๆ เช่น เส้นเลือดตีบ โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน รวมถึงโรคมะเร็ง และโรคหัวใจ เป็นต้น (Margaill, 2005)

สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากภายนอก ได้แก่

1. สารที่ให้ไฮโดรเจนอะตอม ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เช่น สารบิวทิลเลตไฮดรอกซิลอะนิโซลหรือบีเอชเอ (Butylatehydroxylanisole, BHA) สารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น สารเบต้าแคโรทีน วิตามินอี กรดโฟลิก วิตามินซี สารกลุ่มฟีนอลลิก เป็นต้น นอกจากจะให้ไฮโดรเจนอะตอมแล้วตัวของสารเองจะเป็นอนุมูลอิสระเอง แต่จะไม่เกิดอันตรายต่อสารอื่น ๆ เนื่องจากภายในโมเลกุลของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นโครงสร้างวงแหวนเบนซีนริงหรือโมเลกุลที่เป็นพันธะคู่สลับเดี่ยวจะวนไปมาในโมเลกุล หรือที่เรียกว่าเกิดเรโซแนนซ์

2. สารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถจับกับโลหะที่เป็นตัวเร่งการเกิดอนุมูลอิสระ เช่น สารกลุ่มฟีนอลลิก และวิตามินซี เป็นต้น ดังภาพที่ 2-5



Quercetin การจับกันของ Fe^{2+} กับ Quercetin

ภาพที่ 2-5 การจับกับโลหะของสารต้านอนุมูลอิสระ

3. สารที่สามารถจับกับออกซิเจนหรือสารโมเลกุลเล็ก ๆ และมีคุณสมบัติในการเป็นรีดิวซิ่ง (Reducing agent) เช่น วิตามินซี และวิตามินอี เป็นต้น (Valko, 2006)

สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ชนิดา พลานุเวช, 2548)

อนุมูลอิสระเกิดจากผลผลิตที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ในสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมตาบอลิซึม นอกจากนี้พบว่าปัจจัยภายนอก เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet, UV) โอโซน ควันจากท่อไอเสีย ควันจากท่อไอเสีย ควันบุหรี่ และยาบางชนิด เป็นต้น โดยกลไกเกิดดังนี้ เริ่มต้นจากโมเลกุลที่เป็นสารตั้งต้นอาจได้รับความร้อน หรือแสง หรือได้รับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลที่เป็นสารรีดิวซิง (Reducing agent) เช่น เหล็ก (Fe^{2+}) หรืออาจเกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์บางชนิดที่กระตุ้นให้สารตั้งต้นเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร

เนื่องจากมีอิเล็กตรอนวงนอกไม่ครบคู่ ดังนั้นจึงมีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ๆ อนุมูลอิสระเหล่านี้เป็นตัวการสำคัญที่เร่งการเสื่อมสภาพของร่างกาย จะเข้าทำปฏิกิริยากับไขมันในร่างกายเกิด Lipid peroxidation และทำลาย DNA (Deoxyribonucleic acid) ซึ่งทำให้เกิดพยาธิสภาพในร่างกาย เกิดสภาวะของโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือดสมอง โรคความจำเสื่อม โรคพาร์กินสัน รวมทั้งความชรา (Aging) ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนที่สุดในบริเวณใบหน้า

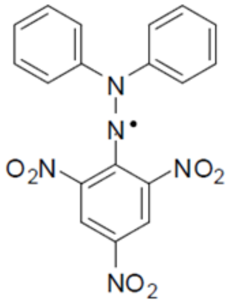
กลุ่มของสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) วิตามิน และเบต้าแคโรทีน (Beta-carotene) เป็นต้น สารต่าง ๆ เหล่านี้เรียกว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ หรือ สารแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidant) ซึ่งจะทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ หรือแม้กระทั่งป้องกันไม่ให้อนุมูลอิสระไปมีผลทำลายเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกาย การได้รับอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จำนวนมาก ๆ จะเป็นผลร้ายต่อสุขภาพ ดังนั้นร่างกายจึงต้องรักษาสมดุลระหว่าง อนุมูลอิสระ กับ สารต่อต้านอนุมูลอิสระ แต่ในสภาวะปัจจุบันมนุษย์จะต้องสัมผัสกับมลภาวะอันเป็นพิษในสิ่งแวดล้อม ซึ่งทำให้ต้องรับเอาอนุมูลอิสระเข้ามาสู่ร่างกายมากขึ้น ทำให้เกินขีดความสามารถของร่างกายที่จะกำจัดอนุมูลอิสระต่อไปได้ทำให้เกิดอนุมูลอิสระส่วนเกินขึ้น ผลที่ตามมาก็คือเกิดการเสื่อมทำลายของเซลล์อันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระส่วนเกินรวมทั้งก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ดังที่ได้กล่าวไปข้างต้น ในวงการเครื่องสำอางจึงให้ความสำคัญเป็นพิเศษกับผลอนุมูลอิสระต่อการเร่งการแก่ของเซลล์ผิวหนังโดยอนุมูลอิสระมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain reaction) ของ Lipid peroxidation และทำให้โครงสร้างของโปรตีน หรือ DNA (deoxyribonucleic acid) เปลี่ยนแปลงไปไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ นอกจากนี้ยังทำลาย Membrane ทำให้เกิดการดูดซึมอาหารของเซลล์รวมทั้งการขับไล่ของเสียออกจากเซลล์ถูกขัดขวางและจะส่งผลให้เกิด Program cell death ตามมา

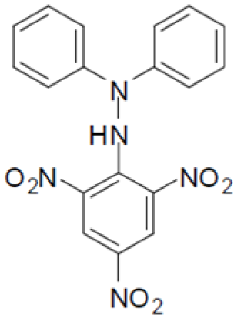
2.5.3 การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถทำได้หลายวิธี แต่ในที่นี้จะขอกล่าวถึง คือ DPPH assay 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)

DPPH assay (ปรียนันท์ บัวสด, 2549) เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งใช้ สารตัวอย่าง คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็น stable radical ในตัวทำละลาย Methanol ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

DPPH คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็นอนุภาคอิสระที่เสถียรและสามารถที่จะ รับอิเล็คตรอนได้อีก เพื่อเปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ ดังภาพที่ 2-6 และเมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้สารดังกล่าวไม่เป็นอนุมูลอิสระ ดังภาพที่ 2-7





ภาพที่ 2-6 Diphenylpicrylhydrazyl (free radical) ภาพที่ 2-7 Diphenylpicrylhydrazyl (non radical)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เป็นการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างง่าย ๆ ที่สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทางเคมี โดยนำสารสกัดหยาบมาตรวจสอบเชิงคุณภาพวิเคราะห์ โดยวิธี TLC (Thin Layer Chromatography) โดยสังเกตการฟอกจางสีสารละลาย DPPH (ปกติสารละลาย DPPH ในตัวทำละลายเมทานอลจะมีสีม่วงเข้ม) ในการนำสารอนุมูลอิสระมาทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หลังจากเกิดปฏิกิริยาจะเกิดการฟอกจางสีจากสีม่วง เป็นไม่มีสี หรือสีเหลืองอ่อนบนพื้น TLC สีม่วง เนื่องจากสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับ DPPH radical ทำให้สีม่วง DPPH จางหายไป จึงเกิดการฟอกจางสีของสารบนแผ่น TLC นั่นแสดงว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะปรากฏการณ์ฟอกจางสีบนพื้นสีม่วง

วิธีทดสอบเชิงคุณภาพวิเคราะห์นี้จะช่วยให้ประหยัดเวลามากขึ้น เมื่อทราบแล้วว่าในสารมีองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ขั้นต่อไปสามารถแยกองค์ประกอบนั้น ๆ ออกจากสารสกัดให้ได้สารบริสุทธิ์เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณวิเคราะห์ต่อไป

ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ สารตัวอย่างจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ (DPPH) ในระยะเวลาที่กำหนด ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโทเมตรี ค่าดูดกลืนแสงที่ได้จะแปรผันกับความเข้มข้นของ DPPH ดังนั้นการลดลงของความเข้มข้นของ DPPH (สีอ่อนลง) บ่งบอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูล อิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ

ถ้าสารต้านอนุมูลอิสระมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มข้นของสารละลาย สีม่วงก็จะลดลง ซึ่งอาจจะรายงานผลทดลองเป็นค่า Fifty percent inhibition concentration (IC_{50}) ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นของสารสกัดต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้ ในการรายงานค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารตัวอย่างเป็น IC_{50} ทำได้โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical scavenging กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง โดยคำนวณ % Radical scavenging

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยากับ Free radical DPPH (% scavenging effect) ดังสมการ

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

เมื่อ $A_{control}$ = ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม

A_{sample} = ค่าดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

DPPH assay เป็นวิธีที่มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่มีความสะดวกรวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้องและมี Reproductivity สูง แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถใช้วิธีนี้วิเคราะห์ Antioxidant activity ของเลือดได้ เพราะต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งทำให้โปรตีนตกตะกอนได้

2.6 เทคนิคแอบซอบชันสเปกโตรสโกปี (Absorption Spectroscopy)

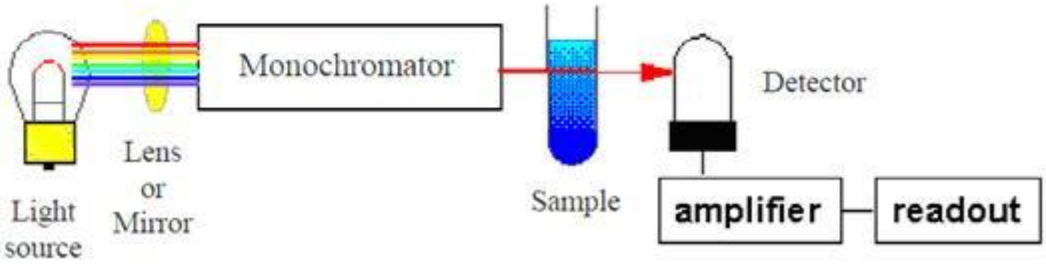
แอบซอบชันสเปกโตรสโกปี เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารโดยอาศัยหลักการดูดกลืนแสง (Light absorption) ของสาร ซึ่งสามารถวิเคราะห์สารทั้งในเชิงปริมาณ (Quantitative analysis) และเชิงคุณภาพ (Qualitative analysis) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ดำเนินการได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ และใช้สารปริมาณน้อย ในระดับไมโครกรัมหรือนาโนกรัม จึงนำมาประยุกต์ใช้ในวิทยาศาสตร์เกือบทุกสาขา ทั้งในด้านการแพทย์ เคมี เภสัชศาสตร์ เกษตรศาสตร์ และสิ่งแวดล้อม เป็นต้น สารที่สามารถดูดกลืนแสงหรือรังสีในช่วงอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิล ซึ่งอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 190-800 นาโนเมตร ได้แก่ สารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อน สารอนินทรีย์ทั้งที่มีสีและไม่มีสี สารที่มี Unsaturated functional group สามารถดูดกลืนแสงในช่วง UV-Visible ได้ โดยการวิเคราะห์อยู่ในรูปของธาตุหรือโมเลกุลก็ได้ แต่ในกรณีที่ต้องพิสูจน์ว่าสารตัวอย่างนั้นเป็นสารอะไร มีโครงสร้างอย่างไร อาจต้องใช้เทคนิคอย่างอื่นด้วย เพื่อเป็นการยืนยันผล เช่น เทคนิค IR, NMR หรือ Mass spectroscopy (แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ, 2553)

2.6.1 การประยุกต์ใช้เทคนิคแอบซอบชันสเปกโตรสโกปีในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

ในการวัดการดูดกลืนแสงที่ดูดกลืนด้วยสารตัวอย่างนั้น ทำได้โดยให้ลำแสงผ่านเข้าไปในสารตัวอย่าง แล้ววัดปริมาณของแสงที่ผ่านทะลุออกมา โดยเปรียบเทียบกับแสงที่ทะลุออกมาเมื่อไม่มีสารตัวอย่าง

Spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดปริมาณของ สารเคมี ชีวโมเลกุล รวมถึงจุลชีพทั้งหลาย โดยใช้หลักการวัดปริมาณของแสงที่ตัวอย่างดูดกลืนเข้าไป ตัวเครื่องประกอบด้วย แหล่ง

กำเนิดแสง (Light source) เลนส์หรือกระจกรับแสง (Lens or Mirror) ตัวแยกความยาวคลื่น (Monochromator) และ ตัวตรวจจับสัญญาณ (Detector) ดังภาพที่ 2-8



ภาพที่ 2-8 หลักการวิเคราะห์สารโดยเทคนิคแอบซอบชันสเปกโตรสโกปี
(อ้างอิงจาก http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=28)

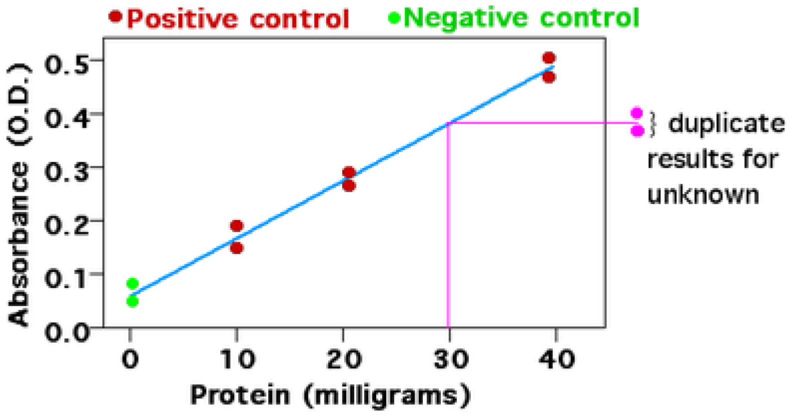
การดูดกลืนแสงจะเป็นไปตามกฎของเบียร์-แลมเบอร์ต (Beer-Lambert law) คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้นของสาร ดังสมการ

$$A = £bC = \log P_0/P_1$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance, A หรือ Optical Density, O.D)
P_0/P_1 = ความเข้มข้นของแสงก่อนวัดและหลังจากการผ่านสารละลาย ตามลำดับ
c = ความเข้มข้นของสาร
b = ระยะทางที่แสงผ่าน
£ = ค่าคงที่ของการดูดกลืนแสง

จากสมการข้างต้น ค่าการดูดกลืนแสง (Aborbance) จะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้น C ของสาร เมื่อค่า b มักมีค่าเป็น 1 เซนติเมตร (ความกว้างของเซลล์ที่บรรจุสาร) จากหลักการนี้นำมาใช้เพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ไม่ทราบค่าได้ โดยเตรียมสารละลายชนิดนั้นที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนตั้งแต่ 3 ค่าขึ้นไป เป็นสารละลายมาตรฐาน (Standard solution) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม แล้วเขียนกราฟมาตรฐาน (Standard or Calibration curve) แสดงความสัมพันธ์ระว่างการดูดกลืนแสงที่วัดได้และความเข้มข้น จะได้กราฟเส้นตรงซึ่งต้องมีจุดเริ่มต้นที่ศูนย์ (Origin) จากนั้นจึงนำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทราบค่า

ความเข้มข้น ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกัน นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ก็จะทราบค่าความเข้มข้นของสารละลายชนิดนั้น (แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ, 2553) ดังแสดงในภาพที่ 2-9



ภาพที่ 2-9 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความ เข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและการใช้ประโยชน์เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (อ้างอิงจาก http://en.wikipedia.org/wiki/Standard_curve)

2.7 เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหารและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดจากสมุนไพร

2.7.1 เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหาร

เนื่องจากอาหารแต่ละชนิดมีองค์ประกอบที่ไม่เหมือนกัน และจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีการผลิตเอนไซม์แตกต่างกัน ฉะนั้นการเน่าเสียของอาหารจึงเกิดจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน ส่วนใหญ่แล้วการเน่าเสียของอาหารมักเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย โดยซึ่งแบคทีเรียนั้นเป็นจุลินทรีย์ที่พบได้อย่างกว้างขวางในธรรมชาติรวมทั้งในอาหาร แบคทีเรียมักทำให้อาหารสด เช่น นมสด ไข่ อาหารทะเล เกิดการเน่าเสีย ซึ่งการเน่าเสียของอาหารนั้นเกิดจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหาร การที่แบคทีเรียจะเติบโตในอาหารได้หรือไม่นั้นขึ้นกับปัจจัยภายในอาหาร เช่น สารอาหาร ค่า pH ความชื้น ปริมาณออกซิเจนและโครงสร้างทางชีววิทยาของอาหารหรือสารยับยั้งในอาหาร เป็นต้น นอกจากนั้นยังขึ้นกับปัจจัยภายนอก เช่น อุณหภูมิที่เก็บอาหาร ความชื้นสัมพัทธ์ และปริมาณก๊าซ เป็นต้น (คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, 2539)

ในงานวิจัยนี้เลือกทดสอบแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย ได้แก่

ก. *Staphylococcus aureus:* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ย้อมติดสีม่วงของแกรมบวก (Gram-positive) ลักษณะของเซลล์เป็นรูปกลม (Cocci) เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น เป็นพวก facultative anaerobic นั่นคือสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โคโลนีของเชื้อนี้บนอาหารแข็งมีสีเหลือง อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 35-37 องศาเซลเซียส เชื้อนี้สามารถเจริญได้ดีในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะอาหารที่มีโปรตีนและอาหารที่ประกอบด้วยส่วนผสมหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีเกลือแกงหรือน้ำตาลสูง โดยมีความทนทานต่อเกลือสูงถึงร้อยละ 10 อาหาร ที่เคยพบการปนเปื้อนของเชื้อนี้คือ สลัดต่าง ๆ ผลิตภัณฑ์ขนมอบ อาหารประเภทเนื้อและของหมัก อาการของผู้ได้รับเชื้อนี้เกิดรวดเร็วรุนแรง และเฉียบพลัน โดยทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพความต้านทานสารพิษของร่างกาย ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อในอาหาร และปริมาณสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นในอาหาร รวมทั้งสภาพร่างกายโดยทั่วไปอาการของผู้ที่ได้รับเชื้อคือ ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้องและอ่อนเพลีย

ข. *Bacillus cereus:* เป็นเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Bacillaceae มีรูปร่างแท่ง ติดสีแกรมบวก มีการเรียงตัวเป็นสายยาว ขนาดความกว้างของเซลล์นั้นมากกว่าหรือเท่ากับ 0.9 ไมโครเมตร และมีสปอร์ที่ทนความร้อนสูง ขนาดเล็กทำให้เซลล์มีรูปร่างไม่เปลี่ยนแปลง เป็นแบคทีเรียพวก Aerobe หรือ facultativeanaerobe อุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญเติบโตได้ คือ ไม่เกิน 75 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญเติบโตได้ คือ 3 องศาเซลเซียส สามารถทนเกลือที่มีความเข้มข้นร้อยละ 12 มักเป็นสาเหตุของการเน่าเสียในอาหารจำพวกที่มีแป้งและโปรตีนเป็นส่วนประกอบ อาจพบในซอสและซุปต่าง ๆ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) เชื้อชนิดนี้สามารถสร้าง Enterotoxin ได้ 2 ชนิด ชนิดหนึ่งทนต่อความร้อน (Heat stable) เป็นสาเหตุให้เกิดอาการอาเจียน ส่วนอีกชนิดหนึ่งถูกทำลายได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน (Heat labile) เป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการโรคอุจจาระร่วง

ค. *Escherichia coli*: เป็นเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Enteroloacteriaceae ย้อมติดสีแดงของแกรมลบ (Gram negative) เป็นเซลล์รูปแท่งท่อนสั้น ๆ สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้ Flagella รอบเซลล์ เจริญเติบโตได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป เป็นพวก Facultative anaerobe เช่นเดียวกับ *S. aureus* อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 35-37 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกรดอินทรีย์ (เช่น กรดแลคติก) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจนได้โดยการย่อยสลายกลูโคส ถ้าผู้บริโภคได้รับประทานอาหารที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนอยู่ จะทำให้เกิดอาการของโรคอุจจาระร่วง คือ

ถ่ายเป็นน้ำ หรือถ่ายเหลวบ่อยครั้ง และมักพบอาการเป็นไข้และอาเจียนร่วมด้วย (สุวิมล กีรติพิบูล, 2546)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากสมุนไพร ได้ดัดแปลงวิธีการมาจากการทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารต้านจุลินทรีย์หรือยาปฏิชีวนะ (Koneman, Allen, Janda, Schreckenberger, & Washington, 1994) ซึ่งสามารถแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 วิธี คือ Dilution Method และ Diffusion Method มีรายละเอียด ดังนี้

Dilution Method

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

Diffusion Method

Diffusion Method เป็นวิธีการทดสอบความไวของสารต้านจุลินทรีย์ ในการยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะอาศัยหลักการที่ว่าสารจะซึมจากที่มีความเข้มข้นสูงไปยังที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นจึงนำสารต้านจุลินทรีย์ ซึ่งอยู่ในรูปแผ่นยาที่เป็นกระดาษกรองหรือเม็ดยาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด นั่นคือวิธีที่ใช้แผ่นกระดาษกรอง (Disc Diffusion Method หรือ Filler Paper Disc) และการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น สามารถสังเกตได้ จากการที่จุลินทรีย์จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในบริเวณโดยรอบที่มีสารต้านจุลินทรีย์อยู่ เป็นที่นิยมกันมาก (Tortora, Berdell, & Christine, 1995) เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ประหยัดค่าใช้จ่าย และใช้เวลาทดลองน้อย แต่วิธีนี้ไม่สามารถอ่านผลได้โดยตรงเป็นค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

จากที่กล่าวมาแล้วนั้น จะเห็นได้ว่าการที่จะเลือกการทดสอบวิธีใดนั้น จะต้องพิจารณาจากความละเอียดที่ผู้ทดลองต้องการจำนวนสารสกัดที่จะทดสอบหาปริมาณของสารสกัดที่มีอยู่นั้น ตลอดจนแรงงาน งบประมาณที่ใช้ในการทดลอง โดยการวิจัยครั้งนี้ได้เลือกวิธีที่เหมาะสมกับการทดลองคือ Diffusion Method

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์โดย Diffusion Method

Diffusion Method เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบความไวในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลินทรีย์ วิธีการนี้มักทำการทดสอบกับสารต้านจุลินทรีย์เพียงความเข้มข้นเดียวเท่านั้น โดยอาศัยหลักการที่ว่า เมื่อใส่สารต้านจุลินทรีย์ปริมาณหนึ่งไว้ในภาชนะบรรจุ (Reservoir) ซึ่งอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar Medium) ที่เพาะเชื้อจุลินทรีย์ไว้ ภายหลังจากการบ่มเพาะเชื้อ ให้สังเกตดูรอบ ๆ บริเวณภาชนะที่ตัวสารต้านจุลินทรีย์ซึมไปนั้นจะมีบริเวณใส (Clear Zone) ที่ไม่มีเชื้อเจริญเติบโต โดยบริเวณใสนี้จะเรียกว่า Inhibition Zone แล้ววัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น เพราะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้นนั้นจะมีขนาดแคบและกว้างแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้นนั้น จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบอีกด้วย (Mckane & Kandel, 1996)

ในอดีตนั้น Diffusion Method เริ่มต้นด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน แล้วใช้แท่งแก้วหรือแท่งเหล็กเจาะบนผิววุ้นให้มีช่องเกิดขึ้น จากนั้นเติมสารละลายของสารต้านจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ ใส่ลงไปในช่องวุ้นเหล่านั้น สารต้านจุลินทรีย์จะแพร่กระจายไปในเนื้อวุ้น โดยสารต้านจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ชนิดนั้น จุลินทรีย์จะไม่เจริญบริเวณรอบ ๆ บริเวณที่มีสารต้านจุลินทรีย์ดังกล่าวอยู่ ซึ่งหากมีบริเวณใดที่ถูกยับยั้งมากนั้น 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 และเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้เฉพาะแต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิด นอกจากนี้วิธีการทดสอบนี้ ยังไม่สามารถอ่านผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้โดยตรง

ปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์โดย Diffusion Method

ปัจจัยหลายชนิดที่มีผลต่อขนาดบริเวณใสที่เกิดจากสารต้านจุลินทรีย์นั้น โดยบางปัจจัยจะรบกวนการออกฤทธิ์หรือการดูดซึมของสารต้านจุลินทรีย์ หรืออาจมีบางปัจจัยที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์มากก็จะทำให้ขนาดบริเวณใสลดลงได้ ส่วนบางปัจจัยที่ส่งเสริม

การออกฤทธิ์หรือการดูดซึมสารต้านจุลินทรีย์ หรือพวกที่รบกวนการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ก็จะทำให้บริเวณใสนี้เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงควรตระหนักถึงปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ ซึ่งปัจจัยที่สำคัญ มีดังนี้

อาหารเลี้ยงเชื้อ

สารต้านจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ นั้น จะถูกกระทบจากส่วนประกอบต่าง ๆ ที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน โดยมีตัวอย่างดังนี้

1. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น จะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ส่วนมากจะเจริญเติบโตได้ดีที่ pH 6.8-7.2 แต่ถ้า pH ต่ำหรือสูงกว่าระดับนี้ จะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ (Pelezar, 1958)

2. บัฟเฟอร์ (Buffer) ในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดนั้น อาจมีผลกระทบต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์บางชนิดได้ เช่น การทดสอบ Gentamicin ในอาหารซึ่งมีความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่างกันจะทำให้ได้ผลการตรวจสอบความไวที่แตกต่างกัน และจุลินทรีย์บางชนิดก็สามารถอยู่ได้ในที่ที่มี 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 นอกจากนี้ในการใช้ยา Tetracyclines ฤทธิ์ของยาจะลดลงเมื่อปริมาณของ Divalent Cation เช่น Ca^{2+} และ Mg^{2+} เพิ่มขึ้น (Koneman et al., 1994)

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

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

6. ความชื้นหรือน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีบทบาทโดยตรงต่อจุลินทรีย์เกี่ยวกับแรงดันออสโมซิสของเซลล์ เพราะผลของแรงดันออสโมซิสที่มีต่อจุลินทรีย์นั้นจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายและชนิดของจุลินทรีย์นั้น ๆ เช่น เซลล์ของ *Escherichia coli* น้ำจะแพร่ออกนอกเซลล์ (Plasmolysis) เมื่อเจริญในสารละลายซูโครสเข้มข้น 12 % เป็นเวลานาน 5-20 นาที ส่วนเซลล์ของแบคทีเรียพวก *Bacillus* มีความสามารถทนต่อสารละลายของเกลือเข้มข้น 10-15 % หรือสารละลายน้ำตาลเข้มข้น 30-60 % ได้ดี (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2536)

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)

ความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ใน Disc ที่ใช้ทดสอบ

ในกรณีที่ใช้แผ่นกระดาษกรอง (Disc) ที่มีสารต้านจุลินทรีย์ที่เตรียมขึ้นเอง โดยการชุบ Disc ลงในสารต้านจุลินทรีย์ อาจจะมีผลทำให้ปริมาณความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ใน Disc แต่ละอันแตกต่างกัน และจะส่งผลต่อขนาดของบริเวณใสที่เกิดจากสารต้านจุลินทรีย์ได้โดยตรง

อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ

อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ มีผลกระทบอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยปกติจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (Psychrophilic Bacteria) และแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดี ที่อุณหภูมิสูงกว่า 75 องศาเซลเซียส (Thermophilic Bacteria) และแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิประมาณ 20-45 องศาเซลเซียส (Mesophilic Bacteria) ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียที่สามารถก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์ เช่น *Salmonella typhi* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น ดังนั้นแล้วอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิด จึงควรปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยในกรณีทดสอบความไวของจุลินทรีย์ที่สามารถทำให้เกิดโรคในมนุษย์ จะใช้อุณหภูมิในการบ่มเชื้อประมาณ 35-37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิเฉลี่ยของสัตว์เลือดอุ่น (Kleyn & Bicknell, 1999)

เวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อ

เวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ และการซึมของสารต้านจุลินทรีย์ใน Agar Medium ได้ ดังนั้นภายหลังวาง Disc แล้วควรนำ Plate ที่ได้เข้าตู้บ่มเชื้อทันที แล้วบ่มเชื้อเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (Collins et al., 1989)

บรรยากาศขณะบ่มเชื้อ

บรรยากาศขณะบ่มเชื้อ มีผลต่อการทดสอบเป็นอย่างมากโดยเฉพาะในการบ่มเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ จะทำให้เกิด Carbonic acid บนพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดสภาวะกรดขึ้น ซึ่งจะมีผลต่อจุลินทรีย์และการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์บางชนิด (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2536)

การวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น

การวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นมีความสำคัญอย่างยิ่ง ที่จะทำให้ผลที่แปรออกมาผิดหรือถูกได้เช่นกัน โดยทั่วไปการวัดขนาดบริเวณใสต้องการความละเอียดเป็นค่ามิลลิเมตร ซึ่งจะวัดได้โดยใช้ไม้บรรทัดคาลิปเปอร์หรือเครื่องมือไฟฟ้า และการที่ขอบบริเวณส่วนใสไม่ชัดเจน คือขอบริม ๆ ที่ยังมีเชื้อจุลินทรีย์ยังเจริญประปราย การวัดขนาดบริเวณใสในลักษณะนี้จะต้องวัดเฉพาะขอบนอกที่ใสสม่ำเสมอ (Ingraham & Ingraham, 1995)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยภายในประเทศ

กฤติกา นรจิตร (2548) ทำการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหารของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชวงค์ขิง 5 ชนิด (ขิง ข่า ขมิ้นชัน กระชายและเร่วหอม) โดยการต้มกลั่นโดยการต้มกลั่นและการสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ปิโตรเลียมอีเทอร์และเอทานอล ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารหอมระเหยด้วย Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS) พบว่า สารประกอบหลักในขิง ได้แก่ Zingiberene และ Farnesene ขมิ้นชัน ได้แก่ Turmerone และ Curlone ในขณะที่สารประกอบหลักของข่าและเร่วหอมที่สกัดด้วยการต้มกลั่น คือ Methyl Chavicol ส่วนที่สกัดด้วยเอทานอล คือ Fraeseol และ Anethole ตามลำดับส่วนน้ำมันหอมระเหยของกระชายที่สกัดด้วยการต้มกลั่นและสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิดมี γ -terpinene และ Geraniol เป็นสารประกอบหลักตามลำดับ การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *E. coli S. aureus B. aureus* และ *L. monocytogenes* พบว่าน้ำมันหอมระเหยของกระชายและเร่วหอมที่ได้จากการต้มกลั่นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ทุกชนิดในขณะที่น้ำมันหอม

ระเหยที่สกัดได้อีก 18 ชนิดไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ได้ส่วนน้ำมันหอมระเหยของขิงจากการต้มกลั่นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิดได้ดีที่สุด

เวียงทอง นุ่นภักดี (2550, บทคัดย่อ) ได้ทำการศึกษาการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของรากพังคี (*Croton crassifolius* geiseler) ซึ่งพังคีเป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่พบได้ทั่วไปในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของรากพังคี พบว่าได้สาร 4 ชนิด คือ Cyperenoic Acid, Chettaphanin-I, Acetylaleuritolic acid และ β-Amyrin แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สกัดรากของพังคี วิทยานิพนธ์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากของต้นพังคี โดยเริ่มจากนำรากของต้นพังคีที่แห้งและบดละเอียดน้ำหนัก 5 กิโลกรัม มาทำการสกัดด้วยเฮกเซน เมทิลลีนคลอไรด์ และเมทานอล ตามลำดับ ได้สารสกัดจากเฮกเซน เมทิลลีนคลอไรด์ และสารสกัดจากเมทานอล เมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพดังต่อไปนี้ การต้านมะเร็ง การต้านเชื้อวัณโรค การต้านเชื้อมาลาเรีย การต้านเชื้อรา การต้านเชื้อไวรัส และความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสารสกัดจากเมทิลลีนคลอไรด์มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.8 μg/ml และต้านเชื้อวัณโรค โดยมีค่า MIC เท่ากับ 100 μg/ml เมื่อนำเอาสารสกัดเมทิลลีนคลอไรด์ มาแยกหาสารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่า ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ Cyperenoic Acid และ Chettaphanin-I ซึ่งโครงสร้างของสารทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว สามารถยืนยันได้ด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี และเมื่อนำสาร Cyperenoic Acid ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสามารถต้านเชื้อวัณโรคได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 100 μg/ml นอกจากนี้สารสกัดมีความสามารถต้านเชื้อไวรัสได้เล็กน้อย ส่วน Chettaphanin-I ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสรุปพบว่าองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ สาร 2 ชนิด คือ Cyperenoic Acid และ Chettaphanin-I โดยพบว่า Cyperenoic Acid มีฤทธิ์ในการต้านต้านเชื้อวัณโรคให้ค่า MIC เท่ากับ 100 μg/ml และสามารถต้านเชื้อไวรัสได้เล็กน้อย ส่วน Chettaphanin-I ไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

อภิชัย พรประเสริฐผล (2555, บทคัดย่อ) ได้ทำการการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีววิทยาของส่วนสกัดจากต้นบอนคูน *Colocasia gigantea* ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Araceae แบ่งเป็น 3 ส่วนคือ การออกแบบระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบในกลุ่มฟีโนลิกจากต้นบอนคูน ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากต้นบอนคูน ในส่วนของการศึกษาการออกแบบตัวทำละลายในการสกัดสารประกอบกลุ่มฟีโนลิกของต้นบอนคูนนั้นพบว่าตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับน้ำนั้น มีค่าการละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบ

กลุ่มฟีโนลิกจากต้นบอนคูนในส่วนของลำต้นใต้ดินและใบคือ 33.6 และ 42.5 MPa ตามลำดับ และในส่วนของการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพศึกษาโดยวิธี disc diffusion method พบว่าสารสกัดที่ได้จากส่วนของใบนั้น มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli, Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดีกว่าสารสกัดที่ได้จากส่วนของลำต้นใต้ดิน และในส่วนของฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์นั้นได้ทำการศึกษากับเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela) มะเร็งผิวหนัง (A375) และเม็ดเลือดขาวปกติของมนุษย์ จากผลการทดลอง สารสกัดที่ได้ในส่วนของใบโดยเฉพาะสารสกัดที่ได้โดยใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลายในการสกัดนั้น เร่งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด แต่ไม่เร่งการเจริญเติบโตเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ ในทางตรงข้ามสารสกัดที่ได้จากส่วนลำต้นใต้ดินโดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายในการสกัดนั้น พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด และเร่งการเจริญเติบโตเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ

งานวิจัยต่างประเทศ

Wong et al. (2006) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีน้ำมันหอมระเหยจากต้นบอนส้ม (*Homalomena sagittifolia* Jungh) ซึ่งเป็นพืชวงศ์บอน (ARACEAE) ทำการศึกษาในประเทศมาเลเซีย จากส่วนใบและเหง้า โดยวิธีการสกัดด้วยวิธีต้มกลั่นด้วยน้ำ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ได้น้ำมันหอมระเหยสีเหลือง ร้อยละที่ได้จากการสกัดของใบเท่ากับ 0.1% (w/w) และส่วนเหง้า 0.2% (w/w) ในงานวิจัยนี้ได้มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (GC) และแก๊สโครมาโทรกราฟฟี/แมสสเปคโทเมตรี (GC/MS) โดยใช้สภาวะในการทดสอบ ดังนี้

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี ใช้รุ่น Hitachi G-3000 มีสภาวะของเครื่องดังนี้

Column : SPB-1 (50 m × 0.20 mm, film thickness 0.33 μm)

และ Supelcowax 10 (30 m × 0.25 mm, film thickness 0.25 μm)

Carrier gas : Helium

Oven : 50 $^{\circ}$C for 1 min, then to 220 $^{\circ}$C/min at 4 $^{\circ}$C for 10 min

Injection : 0.4 μl, Split, Split Ratio 50 : 1, Split flow 1.0 ml/min, 220 $^{\circ}$C

Detector : FID

เครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟฟีแมสสเปคโทเมตรี (GC/MS) รุ่น HP 5989A ใช้สภาวะของเครื่องเช่นเดียวกับเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟฟี รุ่น Hitachi G-3000 ดังกล่าวข้างต้น และพารามิเตอร์ของเครื่องแมสสเปกโทรโฟโทเมตรี คือ

ionization voltage:70 eV

ion source temperature: 200 $^{\circ}$C

scan mass range: 40–350 u.

ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟฟี (GC) และเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟฟี/แมสสเปคโทเมตรี (GC/MS) ได้ผลดังตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 ตารางแสดงองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยจาก *Homalomena sagittifolia* Jungh

No.	Constituent	Retention indices		Area %	
		Supelcowax 10	SPB-1	Leaves	Rhizomes
1	α - Pinene	1026	929	22.2	0.2
2	α - Thujene	1030	922	(0.1)	0.1
3	α - Fenchene	1057	940	t	
4	Camphene	1066	968	0.2	
5	β - Pinene	1112	964	17.2	0.2
6	Sabinene	1121	1002	0.3	0.6
7	Car-3-ene	1141	995	t	1.4
8	α- Phellandrene	1148	995	3.2	
9	Myrcene	1161	978	1.7	0.2
10	α- Terpinene	1174	1008	0.1	0.2
11	Heptan-2-one	1194	869		0.1
12	Limonene	1203	1019	2.0.0.8	0.5
13	β-Phellandrene	1233		0.2	0.1
14	(*Z*)- β-Ocimene	1242	1027	0.2	0.3
15	γ-Terpinene	1252	1047	2.8	0.1
16	(*E*)- β-Ocimene	1270	1037	0.3	0.8
17	*p*-Cymene	1285	1011	0.3	0.1
18	Terpinolene	1311		0.1	
19	(*E*)-4,8-Dimethyl nona-1,3-triene				
20	Haptan-2-ol	1320	887		0.1
21	(*Z*)-Hex-3-en-1-ol	1386		0.1	
22	Nonan-2-one	1391	1071	0.4	3.7

ตารางที่ 2-2 (ต่อ)

No.	Constituent	Retention indices		Area %	
		Supelcowax 10	SPB-1	Leaves	Rhizomes
23	Trans-Linalool oxide (furanoid)	1438	1061	(t)	0.8
24	α-Cubebene	1451	1345	0.2	
25	cis-Linalool oxide (furanoid)	1077	1077		0.7
26	α-Ylangene	1468	1360	0.1	
27	α-Copaene	1482	1371	0.6	
28	Nonan-2-ol	1518		0.2	1.3
29	β-Cubebene	1529		0.2	
30	Linalool	1547	1085	1.2	61.9
31	Linalyl acetate	1555	1238		0.4
32	β- Elemene	1580	1384	1.5	0.1
33	β- Caryophyllene	1583	1412	1.5	0.1
34	Terpinen-4-ol	1594	1158	0.5	2.5
35	Hotrienol	1601			0.2
36	Methyl*(E)*-dec-2-enoate	1619	1299	0.2	
37	Aromadendrene		1432	(0.4)	
38	(E)-β-Farnesene	1658	1445	1.5	
39	α-Humulene	1666	1449	3.9	0.2
40	γ-Muurolene	1680		1.5	t
41	Methyl geranate	1686	1302	0.3	
43	Germacrene D	1701	1471	5.9	(0.1)
44	β-Selinene	1710	1476	1.2	0.1
45	α- Selinene	1716	1486	4.1	0.6

ตารางที่ 2-2 (ต่อ)

No.	Constituent	Retention indices		Area %	
		Supelcowax 10	SPB-1	Leaves	Rhizomes
46	Neryl acetate	1725			0.3
47	β-Bisabolene		1494	(0.6)	
48	Bicyclogermacrene	1730		2.2	
49	Geranyl acetate	1751	1363		0.3
50	δ-Cadinene	1753	1510	2.5	0.6
51	γ-Cadinene	1755	1498	0.7	(0.2)
52	Cadina-1,4-diene		1520	(0.2)	
53	Nerol	1801	1208		1.3
54	Germacrene B	1820		1.3	
55	Geraniol	1846	1235	0.3	0.9
56	*p*- Cymen-8-ol	1848			0.8
59	Ledol	2021			0.4
58	*(E)*-Nerolidol	2045	1547	1.1	
59	Junenol	2052		0.3	
60	*epi*- Cubenol	2060	1613	0.3	(0.1)
61	Globulol	2070	1568	0.3	(0.6)
62	Virdiflorol	2079	1575	0.3	(1.2)
63	Spathulenol	2121	1558	0.1	1.9
64	Neointermedeol	2138	1597	6.5	0.6
65	*T*-Cadinol	2168		0.3	2.1
66	*T*-Muurolol	2184		0.4	1.2
67	Torreyol	2196		0.4	0.3
68	α-Cadinol	2228	1622	0.8	3.4
69	*(E,E)*-Farnesol	2292		0.1	
	Total identified			96.8	94.6

จากการศึกษาพบว่ามีองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากส่วนใบ 59 ชนิด และส่วนเหง้า 49 ชนิด โดยน้ำมันหอมระเหยจากส่วนใบส่วนใหญ่เป็นสารพวก Monoterpne hydrocarbons คิดเป็น 51.6% นั่นคือ α-pinene (22%) และ β-Pinene (17.2%) และสารพวก Sesquiterpenoids germacrene D (5.9%), α-selinene (4.1%), α-humulene (3.9%) และ neointermedeol (6.5%) และน้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหง้าพบสาร จำนวน 49 ชนิด โดยพบว่ามีปริมาณสาร linalool (61.9%) ซึ่งเป็นปริมาณที่พบมากที่สุด และพบ nonan-2-one, terpinen-4-ol, T-cadinol, spathulenol, α-terpineol, car-3-ene และ nonan-2-ol สารที่พบนอกจากนั้นจะมีปริมาณน้อยกว่า 1 %

ในงานวิจัยได้แยกสาร neointermedeol ซึ่งพบจากส่วนใบในน้ำมันหอมระเหยจากต้นบอนส้ม (*Homalomena sagittifolia* Jungh) แล้วศึกษาโครงสร้างของสารโดยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี (NMR spectroscopy) และศึกษาหมู่ฟังก์ชันของสารโดยเครื่อง อินฟราเรด สเปกโทรสโกปี (IR spectroscopy) โดยมีวิธีการศึกษา ดังนี้

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี รุ่น Hitachi G-3000 โดยมีสภาวะเครื่อง ดังนี้

Column : stainless steel (3 m × 5.3 mm i.d., packed with 5% Carbowax 20 M on 100/120 mesh Supelcoport)

Carrier gas : Nitrogen

Oven : 4 °C/min from 100 to 220 °C.

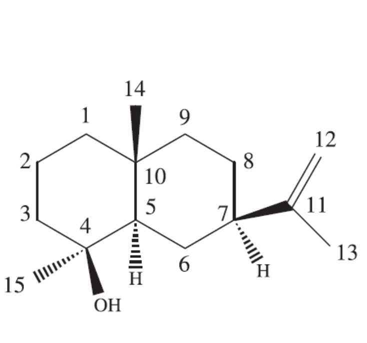
Injection : Split Ratio 1 : 10,Split flow 20 ml/min

Detector : FID

เครื่อง NMR Spectroscopy ใช้สภาวะในการทดลองดังนี้

วิเคราะห์ ^{13}C-NMR ที่ความถี่ 100 MHz และวิเคราะห์ ^{1}H-NMR ที่ความถี่ 400 MHz โดยใช้ตัวทำละลาย $CDCl_3$

ในการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR พบว่าโครงสร้างของ neointermedeol แสดงได้ดังภาพที่ 2-7



ภาพที่ 2-10 สูตรโครงสร้างของ neointermedeol

Ling-Bin Zeng, Zhong-Rong Zhang, Zhu-Hua Luo, and Ji-Xiao Zhu (2011) ได้ทำการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระและองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยจากเหง้า *Homalomenae* ซึ่งเป็นพืชวงศ์บอน (Araceae) ทำการสกัดโดยการกลั่นด้วยน้ำ เป็นเวลา 5 ชั่วโมงจะได้น้ำมันหอมระเหย และในส่วนตัวอย่างที่ได้สกัดที่เป็นของแข็ง (Solid residue) นำมาสกัดต่อโดยใช้ ethyl acetate และส่วนที่ของเหลวที่แยกออกจากน้ำมันนำมาสกัดโดยใช้ Dichloromethane จากนั้นนำสารที่ได้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟฟี/แมสสเปกโทรโฟโตเมตรี และทำการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH assay) การฟอกจากสีของเอบีทีเอส (ABTS assay) การฟอกจางสีของเบตาแคโรทีน (β-carotene bleaching method) วิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Reducing power assay) หาปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค LC-MS/MS และ HPLC ผลการศึกษาพบว่าในองค์ประกอบทางเคมีของเหง้า *Homalomenae* มีสารจำนวน 77 ชนิด คิดเป็น 96.5 % ในน้ำมันหอมระเหย ร้อยละการสกัดเท่ากับ 0.82 % โดยสารส่วนใหญ่ คือสาร *epi-α*-cadinol (14.8%), α-cadinol (14.8%), α-terpineol (13.8%), linalool (11.1%), terpinen-4-ol (4.92%), และ δ-cadinene (4.91%) ในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ *Homalomenae* ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS และ HPLC พบว่ามีสารฟีนอลิกซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ protocatechuic acid, vanillic acid, syringicacid, caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid และ apigenin

Mital and Sumitra (2012) ได้ศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพของใบละมุด *Manilkara zapota* L. (Chiku) ใช้วิธีการสกัดแบบซอกห์เลต โดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ได้แก่ โทลูอีน เอทิลอะซิเตท อะซีโตน น้ำกลั่น และปิโตรเลียมอีเทอร์ จะได้สารสกัดหยาบของใบละมุด แล้วทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH free radical, Superoxide anion radical, Hydroxyl radical และ Reducing capacity assessment ส่วนการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพใช้วิธี Agar well diffusion กับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus megaterium* ATCC9885, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Corynebacterium rubrum* ATCC14898, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228) แบคทีเรียแกรมลบ (*Citrobacter freundii* ATCC10787, *Enterobacter aerogenes* ATCC13048, *Klebsiella pneumoniae* NCIM2719, *Proteus mirabilis* NCIM2241, *Salmonella typhimurium* ATCC23564) และเชื้อรา (*Candida albicans* ATCC2091, *Candida glabrata* NCIM3448, *Cryptococcus leuteotus* ATCC32044, *Candida neoformans* NCIM3542, *Candida tropicalis* ATCC4563) พบว่าในการสกัดด้วยเครื่อง

ซอกห์เลตตัวทำละลายที่ให้เปอร์เซ็นต์การสกัดที่ดีที่สุดคือ น้ำ (16.25%) ปิโตรเลียมอีเทอร์ (7.32%) อะซีโตน (2.98%) โทลูอีน (1.55%) และเอทิล อะซีเตต (0.71%) ตามลำดับ และในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าใบละมุดที่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซีโตนให้ผลการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบและเชื้อราได้ดีที่สุด

Policegoudra et al. (2012) ได้ศึกษาองค์ประกอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพขอน้ำมันหอมระเหยจากว่านเต่าเกียด (*Homalomena aromatic*) ซึ่งเป็นพืชวงศ์บอน และฤทธิ์การต้านเชื้อราและยีสต์ เหง้าว่านเต่าเกียดมีน้ำมันหอมระเหยซึ่งนำมาใช้เป็นส่วนผสมในยาจึงได้มีการทดลองกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากว่านเต่าเกียดโดยวิธีการกลั่นแบบต้มกลั่น ใช้เครื่องกลั่นแบบ Clevenger-type apparatus แล้วทำการวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรโฟโทเมตรี (CG-MS) ที่มีสภาวะดังนี้

Column : Elite-1, dimethylpolysiloxane, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm

Carrier : Helium

Injection : 0.4 μl, rate of 4 °C/1 min, 1ml, column temperature 40-250 °C

ionization voltage : 70 eV

จากผลการวิเคราะห์พบว่ามีสารซึ่งเป็นองค์ประกอบทางเคมีแสดงดังตารางที่ 2-3

ตารางที่ 2-3 ตารางแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Homalomena aromatic*

NO.	Major components	(%)
1	Linalool	*62.5*
2	Terpene-4-ol	7.08
3	δ-Cadinene	5.57
4	*T*-Muurolol	5.32
5	α-Cadinol	3.71
6	Viridiflorol	3.69
7	α-Selinene	2.19
8	*M*-Cymene	2.19
9	Spatulenol	1.81
10	γ-Muurolene	1.81
Total constituents	55	

จากผลการทดลองในเหง้าว่านเต่าเกียด มีองค์ประกอบทางเคมี จำนวน 55 ชนิด โดยการวิเคราะห์พบว่าในน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านเต่าเกียดมีสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ *T*-muurolol (5.32%), Viridiflorol (3.69%), α-selinene (2.19%), *M*-cymene (2.19%) และ γ-Muurolene (1.81%) และมีสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ Linalool (62.5%), Terpene-4-ol (7.08%), δ-cadinene (5.57%), α-cadinol (3.17%) และ Spatulenol (1.81%) ส่วนในการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ทางจุลชีพ โดยทดสอบน้ำมันหอมระเหยกับเชื้อราและเชื้อยีสต์ จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes, Microsporum fulvum, Microsporum gypseum, Trichosporon* และ *Candida albicans* โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน แล้วปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วยสารละลาย sterile saline 0.85% ปรับให้มีความขุ่นที่มีเชื้อประมาณ 1.0×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร แล้วทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราและยีสต์ โดยวิธี Agar well diffusion method โดยละลายน้ำมันหอมระเหยจากว่านเต่าเกียดด้วยสารละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาณ 2 mg/ml จากนั้นหยดสารลงในดิสก์ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone และหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในการยับยั้ง (Minimal Inhibition Concentration หรือ MIC) พบว่าน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราและยีสต์ได้ดี

Siripen, Joseph, Sirnan, and Khanittha (2010) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าเต่าเกียด (*Homalomena aromatic* Schott) โดยทำการสกัดด้วยวิธีต้มกลั่น และวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี/แมสสเปกโทรโฟโทเมตรี (GC/MS) พบว่าวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีได้ 39 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 87.82 ขององค์ประกอบในน้ำมันรวม องค์ประกอบหลักในน้ำมัน ได้แก่ linalool (32.43%), terpinen-4-0 (14.08%) และ sabinene (8.35%)

Rana, Pukhrambamb, Singh, Verdeguer, and BIazquez (2010) ได้ศึกษาองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยของรากว่านเต่าเกียด (*Homalomena aromatic*) โดยนำรากมากลั่นด้วยน้ำ นาน 4 ชั่วโมง แล้วใช้ diethyl ether ในการแยกน้ำมันหอมระเหยกับน้ำ ได้ผลการสกัดคิดเป็นร้อยละ 0.66 และศึกษาองค์ประกอบทางเคมีน้ำมันหอมระเหยด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี/แมสสเปกโทรโฟโทเมตรี (GC/MS) รุ่น Varian Saturn 2000/Varian C.SVA-5MS ดังสภาวะต่อไปนี้

Column : Capillary column 130 m x 0.25 mm i.d, filmthickness 0.25 m)

Carrier gas : Helium

Injection : flow-rate of 2 ml/min(split mode); 0.51; 250 °C

จากการทดลองพบว่าได้สารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยว่านเต่าเกียด คิดเป็น 88.7% องค์ประกอบทางเคมีหลัก คือ linalool (58.3%), terpinen-4-o1(16.7%), α-terpineol (1.8%), α-cadinol (1.7%), spathulenol (1.5%) และ cryptone (1.4%)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชุดเครื่องกลั่นไอน้ำ
2. ชุดเครื่องกลั่นซอกห์เลต
3. เครื่องระเหยสุญญากาศ บริษัท Buchi รุ่น R-124
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง บริษัท Mettler Toledo รุ่น AG203-S
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง บริษัท Mettler Toledo รุ่น AG245
6. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี รุ่น Agilent 7890A
7. เครื่องส่องรังสีเหนือม่วง
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer) บริษัท Analytik-Jena AG

3.1.2 อุปกรณ์

1. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25, 50,100, 500 มิลลิลิตร
2. ขวดบรรจุสาร (vial) ขนาด 5 มิลลิลิตร
3. บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 500 มิลลิลิตร
4. กระบอกตวง ขนาด 10 มิลลิลิตร
5. อะลูมิเนียมฟอยล์
6. ถาดอะลูมิเนียม
7. โถดูดความชื้น
8. แท่งแก้วคนสาร/ช้อนตักสาร
9. กระดาษกรอง
10. ไมโครปิเปต
11. แผ่น TLC
12. พาราฟิล์ม
13. หลอดคะปิลลารี

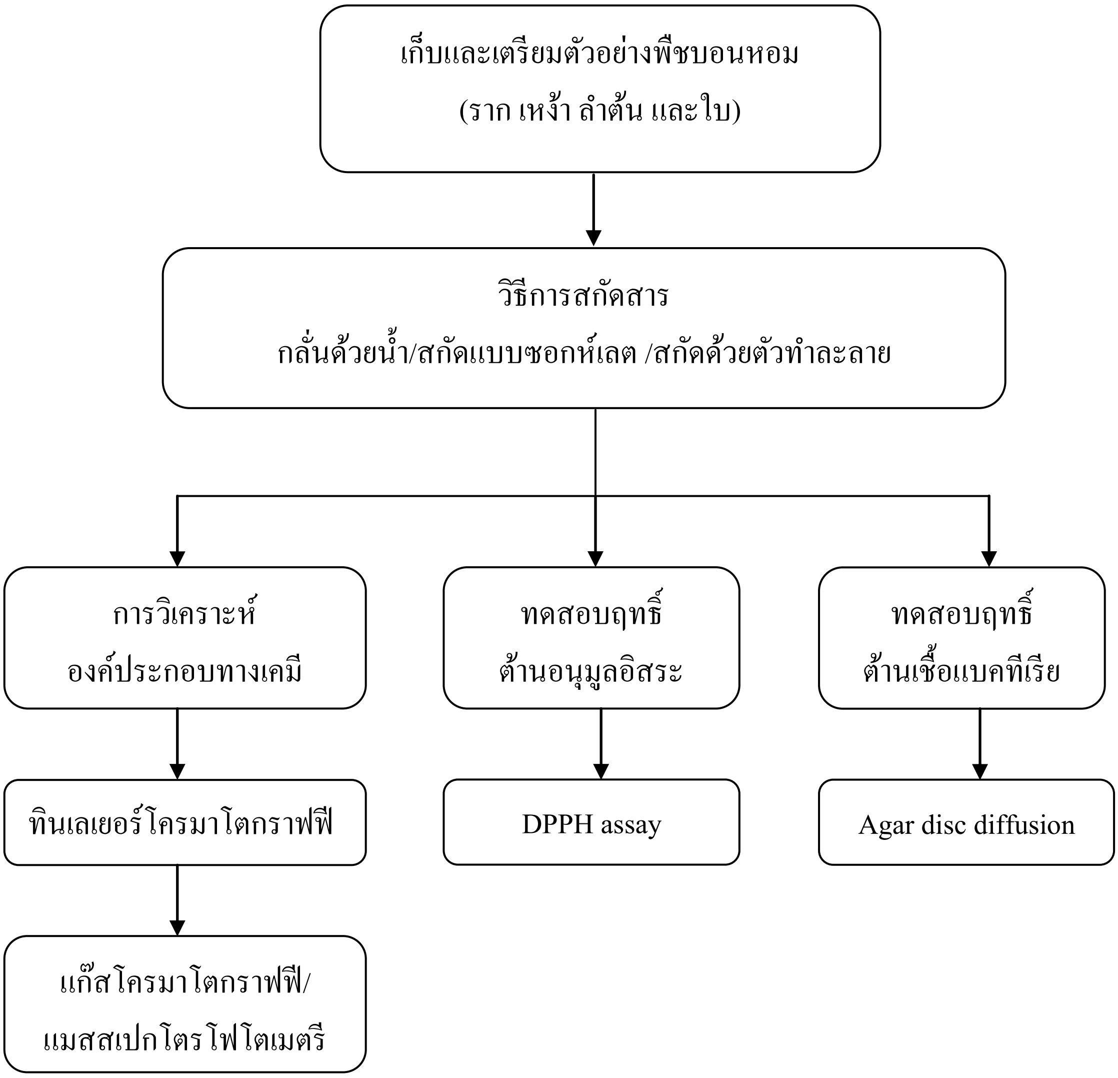
3.1.3 สารเคมี

1. Dichloromethane: CH_2Cl_2, commercial grade บริษัท J. T. Baker, USA
2. Ethyl acetate:CH: AtOAc, commercial grade บริษัท J. T. Baker, USA
3. Methanol : CH_3OH, commercial grade บริษัท J. T. Baker, Germany
4. Ethanol: C_2H_5OH, commercial grade
5. Hexane: C_6H_{12}, commercial grade บริษัท J. T. Baker, Germany
6. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) บริษัท Fuka, Germany
7. Aluminum chloride ($AlCl_3$)
8. Bismuth subnitrate, AR grade, บริษัท Riedel-De-Hacn.
9. Tartaric acid:$C_4H_6O_6$, RPE grade, บริษัท Carlo Erba.
10. Potassium iodide:KI, GR grade, บริษัท Merck.
11. Glacial acetic acid บริษัท Sigma-Aldrich
12. *P*-anisalaldehyde
13. sulfuric acid
14. Sodium sulphate anhydrous
15. Gallic acid บริษัท Fuka, Germany
16. Ascrobic acid บริษัท Fuka, Germany
17. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) บริษัท Fuka, Germany
18. Tetracycline
19. 0.85% NaCl
20. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller - Hinton broth (MHB)
21. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA)
22. เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Escherichia coli* ATCC 25922

3.1.4 พืชตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

บอนหอม (ส่วนราก เหง้า ลำต้นและใบ) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Homalomena Rostrata* Griff.

3.2 วิธีการวิจัย



ภาพที่ 3-1 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย

3.2.1 การเก็บตัวอย่างบอนหอม

ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างบอนหอม จากป่าในเขตบ้านนาหมอ ตำบลเมืองลี อำเภอนาหมื่น จังหวัดน่าน วันที่ 16 ธันวาคม พ.ศ. 2556

3.2.2 วิธีการสกัดสารสกัดบอนหอม

3.2.2.1 การกลั่นด้วยน้ำ

1. นำบอนหอมสด (ส่วนราก เหง้า ลำต้น และใบ) มาล้างให้สะอาด ผึ่งลมให้แห้ง ภายใต้อุณหภูมิห้อง จากนั้นหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ให้มีน้ำหนักจำนวน 2 กิโลกรัม

2. นำบอนหอมแต่ละส่วนประกอบมากลั่นน้ำมันหอมระเหยด้วยการกลั่นด้วยน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นที่มีส่วนผสมของน้ำปนอยู่บางส่วน ทำการแยกน้ำส่วนที่เหลืออยู่โดยการเติม Sodium sulphate anhydrous จากนั้นนำไปกรองเอา Sodium sulfate anhydrous ออกจะได้น้ำมันหอมระเหยสีเหลืองที่บริสุทธิ์ (กรณีที่น้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้เป็นอิมัลชัน นำส่วนของน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้ ทำการสกัดแยกชั้นด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน นำสารชั้นไดคลอโรมีเทนที่อยู่ด้านล่างไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และเครื่องดูดสุญญากาศตามลำดับ จะได้น้ำมันหอมระเหยสีเหลืองบริสุทธิ์)

4. นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้มาชั่งโดยใช้เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

5. นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้เก็บใส่ไว้ในขวดรีเอเจนต์สีชา แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์

6. หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทางการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และนำน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ดีที่สุดมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี

3.2.2.2 การสกัดโดยเครื่องสกัดแบบซอกห์เลต

1. นำบอนหอมสด (ส่วนราก เหง้า ลำต้น และใบ) มาล้างให้สะอาด ผึ่งลมให้แห้ง ภายใต้อุณหภูมิห้อง จากนั้นหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ให้มีน้ำหนักประมาณ 50 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน)

2. นำไปใส่ทิมเบิล หรือถุงสกัด เติมตัวทำละลายเอทานอลลงไปประมาณ 2 ใน 3 ของขวดก้นกลม 250 มิลลิลิตร ของชุดสกัดซอกห์เลต ทำการสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. นำสารที่สกัดได้ไประเหยตัวทำละลายออกให้แห้งโดยเครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator) จะได้ส่วนสกัดที่เรียกว่า “concrete”

4. นำสารสกัดที่ได้มาชั่งโดยใช้เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

5. นำสารสกัดที่สกัดได้ เก็บใส่ไว้ในขวดรีเอเจนต์สีชา แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์

6. หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทางการยับยั้งแบคทีเรีย และนำสารสกัดที่มีฤทธิ์ดีที่สุดมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี

3.2.2.3 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

1. นำบอนหอมสด (ส่วนราก เหง้า ลำต้น และใบ) ชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ให้มีน้ำหนักประมาณ 500 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) แล้วแช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอลเป็นเวลา 3 วัน

2. นำส่วนต่าง ๆ ของบอนหอม ที่แช่ในตัวทำละลายเอทานอล มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และเครื่องดูดสุญญากาศตามลำดับ จะได้สารสกัดหยาบ

3. นำสารสกัดหยาบที่ได้มาชั่งโดยใช้เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4. นำสารสกัดหยาบที่ได้แบ่งเป็น 3 ส่วน ใส่ไว้ในขวดบรรจุสารสีชา (Vial) แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์

5. นำสารสกัดหยาบส่วนที่ 1 มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี และแก๊สโครมาโตกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี

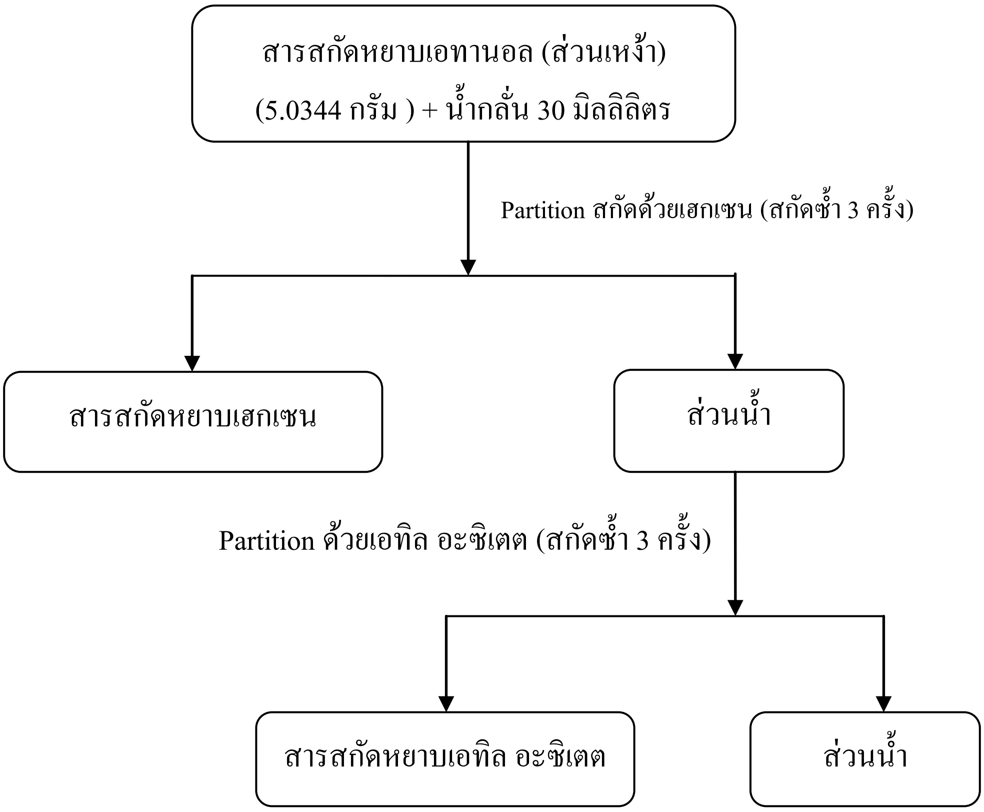
6. นำสารสกัดหยาบส่วนที่ 2 มาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

7. นำสารสกัดหยาบส่วน 3 มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทางการยับยั้งแบคทีเรีย

3.2.2.4. การสกัดสารสกัดหยาบบอนหอมส่วนเหง้า (สกัดด้วยเอทานอล) ด้วยวิธี Partition

1. ชั่งสารสกัดบอนหอมที่สกัดด้วยเอทานอล จำนวน 5.0344 กรัม มาทำการ partition ด้วยการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซนด้วยกรวยแยก แล้วเติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร จากนั้นแยกระหว่างชั้นน้ำและชั้นสารละลาย นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นลดความดันไอจะได้สารสกัดในชั้นของเอกเซน

2. เติมเอทิล อะซิเตต ลงในสารที่เหลือจากข้อ 1 ทำการสกัดเช่นเดียวกัน จะได้สารสกัดเหง้าบอนหอมในชั้นของเอทิล อะซิเตต



ภาพที่ 3-2 แผนผังแสดงการ Partition สารสกัดหยาบเอทานอล (ส่วนเหง้า)

3.2.3 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากบอนหอม

3.2.3.1 การหาระบบตัวทำละลาย

การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสาร ด้วยเทคนิค TLC โดยนำตัวทำละลายมาผสมกันในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน แล้วนำไปใส่ใน Chamber ปิดฝาทิ้งไว้ให้อิ่มตัว ซึ่งทำได้โดยแบ่งส่วนสกัดบอนหอมด้วยวิธีต่าง ๆ ออกมาเพียงเล็กน้อยใส่ใน Vial แล้วเติมตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนลงไป จากนั้นทำการ Spot สารลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้ แล้วนำแผ่น TLC ไปจุ่มลงใน Chamber ที่เตรียมไว้ปิดฝา ปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปจนถึงระดับที่กำหนดไว้ นำแผ่น TLC ออกมารอจนแห้งแล้วนำไปทดสอบด้วยแหล่งกำเนิดแสงยูวี

การเตรียมโครมาโทแกรม

1. เตรียมแผ่นโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) ที่มีตัวดูดซับเป็น Silica gel GF254 ใช้ดินสอขีดเส้นตรงบาง ห่างจากขอบด้านหนึ่งประมาณ 1 เซนติเมตร เพื่อเป็นแนวจุดสารเริ่มต้น โดยเส้นนี้ต้องอยู่เหนือระดับตัวทำละลาย นำสารสกัดหยาบของพืชตัวอย่างมาจุดบนแผ่น TLC

2. เตรียมระบบตัวทำละลาย TLC เตรียมสารละลายผสมประกอบด้วย Ethyl acetate: Hexane (1:3) นำหลอดคะปิลลารีมาจุ่มสารส่วนสกัดหยาบแล้วนำมาจุดบน TLC ตรงตำแหน่งบนเส้นดินสอ ปล่อยให้แห้ง แล้วจุดสารลงไปซ้ำหลายครั้งจนได้สารสกัดเข้มข้น ใช้ดินสอกำหนดตำแหน่งระดับตัวทำละลายสิ้นสุดขอบบนแล้วนำแผ่น TLC ที่จุดสารแล้วไปจุ่มในขวดที่บรรจุตัวทำละลาย ระมัดระวังให้สารต้องอยู่เหนือระดับตัวทำละลาย ปิดฝา แล้วปล่อยให้ตัวทำละลายซึมผ่านแผ่น TLC จนถึงตำแหน่งสิ้นสุดของตัวทำละลาย ให้นำแผ่น TLC ออกมา ผึ่งให้แห้ง สังเกตและบันทึกโครมาโทแกรม

3. นำแผ่นโครมาโทรแกรมมาตรวจสอบการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ด้วยเครื่องส่องรังสีเหนือม่วง (UV-Light) มองที่แผ่น TLC ระมัดระวังอย่ามอง หลอดแสง UV โดยตรง บันทึกภาพโครมาโทรแกรมภายใต้แสง UV

4. ทำการทดลองหาระบบตัวทำละลายอื่น ๆ ที่สามารถแยกสารได้ดีที่สุด โดยปรับระบบ ตัวทำละลายพิจารณาเพิ่มความมีขั้ว โดยปรับอัตราส่วน Ethyl acetate:Hexane เป็น 2: 3 หรือ 1:1 หรือ ใช้ตัวทำละลายอื่น เช่น Hexane : Dichloromethane ที่อัตราส่วนต่าง ๆ เป็นต้น

3.2.3.2 การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารอินทรีย์ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในพืชโดยเทคนิค โครมาโทรกราฟฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีอยู่ในพืชส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มสารฟีนอล เทอร์พีน สเตอรอยด์ และอัลคาลอยด์ การตรวจสอบองค์ประกอบของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเบื้องต้นในสารสกัดจากพืช นิยมใช้ปฏิกิริยาเคมีของสารกลุ่มต่าง ๆ เหล่านี้กับรีเอเจนท์ที่ทำให้เกิดตะกอน หรือสารละลายที่มีสีที่สามารถมองเห็นด้วยตาได้ การทดสอบเชิงคุณภาพสามารถทำโดยเทคนิคโครมาโทรกราฟฟีแบบแผ่นบาง โดยใช้ระบบที่เหมาะสมมาทำการทดลอง แล้วใช้รีเอเจนท์สเปรย์ให้สารทำปฏิกิริยาบนแผ่นโครมาโทแกรม สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้น

รีเอเจนท์ที่ใช้สเปรย์ บนโครมาโทแกรมเพื่อทดสอบสารต่างมีดังนี้

1. ทดสอบฟลาโวนอยด์ ด้วยสารละลาย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ ในเอทานอล สารฟลาโวนอยด์ จะปรากฏสีเหลืองเรืองแสงในแสง UV ความยาวช่วงคลื่น 360 nm

2. ทดสอบ ฟีนอล น้ำตาล สเตอรอยด์ และเทอร์พีนด้วยสารละลาย *p*-anisaldehydesulfuric acid และนำแผ่นโครมาโทแกรมไปให้ความร้อน ที่ 105 องศาเซลเซียส จนเห็นสีชัดเจนสารประเภทฟีนอล เทอร์พีน น้ำตาล และสเตอรอยด์ จะเห็นจุดสารบนแผ่น TLC เป็นสีม่วง น้ำเงิน แดง เทา และเขียว

3. ทดสอบสารประกอบไนโตรเจน อัลคาลอยด์ ด้วยสารละลายดราเจนดอร์ฟ (Dragendoff) สารประเภทไนโตรเจนและอัลคาลอยด์จะเห็นจุดสารบนแผ่น TLC เป็นสีส้มถึงสีเหลือง

4. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยสารละลาย DPPH ในเมทานอลที่มีความเข้มข้น 0.2 mM โดยการพ่นสารละลาย DPPH ซึ่งมีสีม่วงเข้มลงบนแผ่น TLC สังเกตตำแหน่งใดที่ปรากฏการฟอกจางสีบนพื้นสีม่วง แสดงว่าสารที่ตำแหน่งนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับ DPPH radical ทำให้สีม่วงของ DPPH หายไป

3.2.3.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี มีวิธีการดังนี้

1. นำสารสกัดจากบอนหอม ที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุด มาทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี

2. เลือกสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดบอนหอม ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี

Column : DB-5ms (30 m × 0.25 mm , film thickness 0.25 μm) J&W 122-5532

Carrier : Helium

Oven : 50 °C for 3 min, then to 220 °C/min at 4 °C for 10 min

Injection : 1.0 μl, Split, Split Ratio 5 : 1, Split flow 3.7894 ml/min, 220 °C

Detector : MSD, 230 °C transfer line full scan at m/z 30-650 u.

MS Source : 220 °C maximum 250 °C

MS Quad : 150 °C maximum 200 °C

3.2.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ (พัชรี คล้ายวัฒนะ, 2550)

การตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดบอนหอม โดยใช้วิธีทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH Assay) โดยวิธีธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (ตรวจวัดเชิงคุณภาพ) การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารอินทรีย์ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในพืช โดยเทคนิคโครมาโทรกราฟฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC) ดังการทดลอง 3.2.3.2 และวิธีทางสเปกโทรโฟโตเมตริก (ตรวจวัดเชิงปริมาณ) โดยมีวิธีการทดสอบดังต่อไปนี้

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน 2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH) radical ความเข้มข้น 0.2 mM ในเอทานอล

2. เตรียมสารละลายต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ของกรดแกลิค กรดแอสคอบิกส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันระหว่าง 5-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 6 ความเข้มข้น และให้สารละลายแต่ละความเข้มข้นมีปริมาตรสุดท้าย 2.0 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเอทานอล)

3. เตรียมสารละลายตัวอย่างบอนหอม AL, CS และ CRH ให้มีความเข้มข้น 5, 10, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเอทานอล

4. เตรียมสารละลาย Control โดยใช้เอทานอล

5. ทำการตรวจวัดคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเชิงปริมาณ โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

6. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน DPPH ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลายต้านอนุมูลอิสระ กรดแกลิค และกรดแอสครอบิก แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ในที่มืด นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

7. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน DPPH ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลายสกัดจากบอนหอม AL, CS และ CRH แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืด นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

8. คำนวณค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH ดังสมการ

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

เมื่อ $A_{control}$ = ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม

A_{sample} = ค่าดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

9. การคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระที่ 50% (IC_{50}) (พัชรี คล้ายวัฒนะ, 2550)

IC_{50} คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH˙ ได้ 50% สามารถคำนวณได้โดยทำการพล็อตกราฟระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสาร แล้วหาสมการเส้นตรง (หรือลากกราฟที่ร้อยละการต้านเท่ากับ 50 ก็จะได้ค่าความเข้มข้นของสารสกัด) แทนค่า y ด้วย 50 จะได้ค่า x คือ ค่าความสามารถของปริมาณสารที่ทำการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง ถ้าค่าน้อยแสดงว่ามีการต้านอนุมูลอิสระมาก

3.2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

การเตรียมหัวเชื้อสำหรับทดสอบ

1. เลี้ยงแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2. ใช้ลวดเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีของเชื้อทดสอบประมาณ 5 โคโลนี เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller - Hinton broth (MHB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง

3. ปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วย 0.85% NaCl ให้มีความขุ่นเท่ากับMcFarland standard No. 0.5 ซึ่งมีเชื้อประมาณ 1.5×10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร และทำการนับจำนวนเชื้อด้วยวิธีการ drop plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA)

ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น โดยวิธี disc diffusion

1. ละลายสารสกัดจากบอนหอมด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นหยดสารบอนหอมลงในดิสก์ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์) และหยด DMSO ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายลงในดิสก์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (Negative control) ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที

2. ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อที่เตรียมไว้ซึ่งมีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 จากนั้นป้ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA)ให้ทั่ว (อาหาร MHA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร) โดยป้ายในแนว 3 ระนาบ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 3-5 นาที และใช้ปากคีบปราศจากเชื้อหยิบแผ่นดิสก์ที่บรรจุสารทดสอบ (Paper disc) คือ ดิสก์ยา tetracycline ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (Positive control) และดิสก์บรรจุสารละลาย DMSO ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (Negative control) วางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นอ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 สารสกัดจากส่วนราก เหง้า ลำต้น และใบบอนหอม

จากการนำบอนหอมส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ส่วนราก เหง้า ลำต้น และใบ มาทำการสกัดด้วยวิธีการสกัด 3 วิธี คือ วิธีการกลั่นด้วยน้ำ วิธีสกัดแบบซอกห์เลต และวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย ซึ่งในวิธีการสกัดแบบซอกห์เลตทำการสกัดสารบอนหอมโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เอทานอล และเฮกเซน เมื่อทำการสกัดสารสกัดบอนหอมแล้ว นำสารสกัดแต่ละส่วนสกัดไปทำการระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้สารสกัดทั้งหมด 14 ชนิด โดยผลการสกัดที่ได้แสดงดังตารางที่ 4-1 จากตารางพบว่าในการสกัดสารจากส่วนต่าง ๆ ของต้นบอนหอม โดยใช้วิธีการสกัดที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบแต่ละส่วนสกัดของบอนหอม พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอลให้ร้อยละการสกัดมากที่สุด รองลงมาคือ การสกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายเฮกเซน การสกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายเอทานอล และการกลั่นด้วยน้ำ ตามลำดับ โดยทุกวิธีการสกัดส่วนสกัดที่ให้ปริมาณสารสกัดสูงสุด คือ ส่วนเหง้า ราก ใบ และลำต้น ตามลำดับ

และผู้วิจัยได้นำสารสกัดหยาบเอทานอล ส่วนเหง้ามาทำการสกัดด้วยวิธี Partition ในชั้นตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ ชั้นเฮกเซนและชั้นเอทิล อะซิเตต โดยได้ทำการสกัดโดยวิธี Partition เพิ่มเติม หลังจากได้ทำการทดลองหาระบบตัวทำละลาย และการทดสอบกลุ่มสารสกัดบอนหอม โดยจะกล่าวถึงต่อไป ซึ่งได้ผลการสกัดดังตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ลักษณะและปริมาณที่สกัดได้ (Yield) ของส่วนสกัดบอนหอม

วิธีการสกัด	ส่วนสกัดบอนหอม	ลักษณะส่วนสกัดบอนหอม	น้ำหนักสารสกัด (g)	ร้อยละการสกัด (%)
กลั่นด้วยน้ำ	ราก (AR)	ของเหลว สีเหลืองอ่อน	0.64	0.02
	เหง้า (ARH)	ของเหลวสีเหลืองเข้ม	1.75	0.09
	ลำต้น (AS)	ของเหลวสีเหลืองแกมน้ำตาล	0.29	0.01
	ใบ (AL)	ของเหลวสีเหลืองอ่อน	0.51	0.03
ซอกห์เลต (เอทานอล)	ราก (BR1)	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.93	1.74
	เหง้า (BRH1)	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.97	1.90
	ลำต้น (BS1)	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแกมดำ	0.78	1.53
	ใบ (BL1)	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแกมดำ	0.98	1.70
ซอกห์เลต (เฮกเซน)	ราก (BR2)	ของเหลวสีเหลือง	0.99	1.97
	เหง้า (BRH2)	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน	1.21	2.34
	ลำต้น (BS2)	ของเหลวหนืดสีเขียวแก่	0.96	1.85
	ใบ (BL2)	ของเหลวหนืดสีเขียวอ่อน	0.95	1.92
สกัดด้วยเอทานอล	ราก (CR)	-	-	-
	เหง้า (CRH)	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล	19.97	3.99
	ลำต้น (CS)	ของเหลวหนืดสีเขียวแก่	10.33	2.07
	ใบ (CL)	-	-	-
สกัดโดยวิธี Partition	เหง้า (CRH1)[a]	ของเหลวหนืดสีส้มเหลืองเข้ม	0.09	1.81
	เหง้า (CRH2)[b]	ของเหลวหนืดสีแดงอิฐ	0.04	0.82

<u>หมายเหตุ</u> - คือ ไม่ได้ทำการสกัด

a คือ สารสกัดหยาบบอนหอมส่วนเหง้าที่ Partition ในชั้นเฮกเซน

b คือ สารสกัดหยาบบอนหอมส่วนเหง้าที่ Partition ในชั้นเอทิลอะซิเตต

4.2 การหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดบอนหอม

4.2.1 การหาระบบการแยกสาร

ในการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารสกัดบอนหอม จากวิธีการกลั่นด้วยน้ำ สกัดแบบซอกห์เลต และสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ด้วยเทคนิค TLC ได้ผลการทดลอง (รูปภาพแสดงในภาคผนวก ค) ดังนี้

4.2.1.1 ระบบของการกลั่นด้วยน้ำ

ทดลองโดยใช้ระบบตัวพา คือ 5% EtOAc:Hexane, 10% EtOAc:Hexane และ 20% EtOAc:Hexane นำผลการตรวจสอบระบบตัวทำละลาย TLC หาค่า R_f (Rate of flow) ขององค์ประกอบสารสกัดบอนหอม ดังตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 ค่า R_f ระบบตัวทำละลาย ของสารสกัดบอนหอมที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ

ระบบตัวทำละลาย	ค่า R_f ของสารสกัดบอนหอม			
	ราก (AR)	เหง้า (ARH)	ลำต้น (AS)	ใบ (AL)
5% EtOAc:Hexane	0.26	0.24, 0.33, 0.46, 0.58, 0.70, 0.78	0.26	0.26
10% EtOAc:Hexane	0.50	0.48, 0.62, 0.76, 0.90	0.51	0.52
20% EtOAc:Hexane	0.74	0.73, 0.79, 0.88, 0.94	0.72	0.75

ในการทดลอง ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด คือ 5% EtOAc:Hexane ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดทุกส่วนสกัด ถูกตัวทำละลายพาขึ้นไปในระยะทางที่เหมาะสม มีค่า R_f อยู่ช่วงกลาง ๆ ส่วนระบบ 10% EtOAc:Hexane และ 20% EtOAc:Hexane สารถูกตัวทำละลายพาขึ้นไปอยู่ที่ด้านบนของแผ่น TLC มีค่า R_f ค่อนข้างสูง

4.2.1.2 ระบบของการสกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายเอทานอล

ทดลองโดยใช้ระบบตัวพา คือ 20% EtOAc:Hexane, 30% EtOAc:Hexane และ 40% EtOAc:Hexane นำผลการตรวจสอบระบบตัวทำละลาย TLC หาค่า R_f(Rate of flow) ขององค์ประกอบ

สารสกัดบอนหอม ดังตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 ค่า R_f ระบบตัวทำละลาย ของสารสกัดบอนหอมที่สกัดแบบซอกห์เลต ด้วยตัวทำละลายเอทานอล

ระบบตัวทำละลาย	ค่า R_f ของสารสกัดบอนหอม			
	ราก (BR1)	เหง้า (BRH1)	ลำต้น (BS1)	ใบ (BL1)
20% EtOAc:Hexane	0.12	0.04, 0.14	0.12	0.10
30% EtOAc:Hexane	-	0.36	0.72, 0.82	-
40% EtOAc:Hexane	-	0.62, 0.82	-	-

หมายเหตุ - คือ มองไม่เห็นจุดของสารบนแผ่น TLC ที่ส่องผ่านแสง UV

ในการทดลอง ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด คือ 20% EtOAc:Hexane ทั้งนี้เนื่องจากระบบ 30% EtOAc:Hexane และ 40% EtOAc:Hexane สารถูกชะขึ้นไปเป็นแถบใหญ่อยู่ที่ด้านบนของแผ่น TLC

4.2.1.3 ระบบของการสกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

ทดลองโดยใช้ระบบตัวพา คือ 10% EtOAc:Hexane, 20% EtOAc:Hexane และ 30% EtOAc:Hexane นำผลการตรวจสอบระบบตัวทำละลาย TLC หาค่า R_f (Rate of flow) ขององค์ประกอบสารสกัดบอนหอม ดังตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-4 ค่า R_f ระบบตัวทำละลาย ของสารสกัดบอนหอมที่สกัดแบบซอกห์เลต ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

ระบบตัวทำละลาย	ค่า R_f ของสารสกัดบอนหอม			
	ราก (BR2)	เหง้า (BRH2)	ลำต้น (BS2)	ใบ (BL2)
10% EtOAc:Hexane	0.16	-	0.17	0.18
20% EtOAc:Hexane	0.02, 0.03, 0.44	-	0.01	0.02, 0.44
30% EtOAc:Hexane	0.02, 0.05, 0.25	-	0.02, 0.05	0.05, 0.93

หมายเหตุ - คือ มองไม่เห็นจุดของสารบนแผ่น TLC ที่ส่องผ่านแสง UV

ในการทดลอง ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด คือ 20% EtOAc:Hexane ทั้งนี้เนื่องจากระบบ 10% EtOAc:Hexane สารอยู่ในระยะทางที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งสารบางตัวอาจยังไม่ถูกพาออกมา ส่วน 30% EtOAc:Hexane สารถูกชะขึ้นไปเป็นแถบอยู่ที่ด้านบนของแผ่น TLC และสารบางตัวอยู่ในระยะทางที่สูงเกินไป สารบางตัวอาจถูกชะพาขึ้นไปอยู่ที่แถบด้านบนแผ่น TLC ซึ่งบ่งบอกถึงระบบการแยกสารที่ไม่ดี

4.2.1.4 ระบบของการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล

ทดลองโดยใช้ระบบตัวพา คือ 5% EtOAc:Hexane, 10% EtOAc:Hexane, 20% EtOAc:Hexane, 50% EtOAc:Hexane, 100% EtOAC, 10% MeOH:Hexane, 2%MeOH:Hexane, 2% MeOH:CH_2Cl_2, 50% Acetone:MeOH, 5% MeOH:EtOAc, 2% MeOH:EtOAc และ CH_2Cl_2: Hexane:MeOH (70:30:1) ผลการตรวจสอบระบบตัวทำละลายของ TLC หาค่า R_f (Rate of flow) ขององค์ประกอบสารสกัดบอนหอม ดังตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 ค่า R_f ระบบตัวทำละลาย ของสารสกัดบอนหอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล

ระบบตัวทำละลาย	ค่า R_f ของสารสกัดบอนหอม	
	เหง้า (CRH)	ลำต้น (CS)
5% EtOAc:Hexane	-	-
10% EtOAc:Hexane	-	-
20% EtOAc:Hexane	-	-
50% EtOAc:Hexane	-	-
100% EtOAC	-	-
10% MeOH:Hexane	-	-
2% MeOH:Hexane	0.05	0.04
2% MeOH:CH_2Cl_2	-	-
50% Acetone:MeOH	-	-
5% MeOH:EtoAC	-	-
2% MeOH:EtOAC	-	-
CH_2Cl_2:Hexane:MeOH (70:30:1)	-	-

<u>หมายเหตุ</u> - คือ มองไม่เห็นจุดของสารบนแผ่น TLC ที่ส่องผ่านแสง UV

ในการทดลองพบว่าระบบที่เหมาะสมที่สุด คือ 2% MeOH:Hexane เนื่องจากในระบบ 5% EtOAc:Hexane, 10% EtOAc:Hexane, 20%EtOAc:Hexane, 50%EtOAc:Hexane, 100% EtOAc สารไม่ถูกตัวทำละลายพาขึ้นไป และ 10% MeOH:Hexane, 2%MeOH:EtOAC, 2% MeOH:CH_2Cl_2, 50% Acetone:MeOH, 5% MeOH:EtoAC, 2% MeOH:EtOAC และ CH_2Cl_2: Hexane:MeOH (70:30:1) สารถูกชะโดยตัวทำละลายขึ้นไปเป็นแถบยาว บนแผ่น TLC

4.2.1.5 ระบบของการ Partition สารสกัดหยาบเอทานอลส่วนเหง้าบอนหอม

ทดลองโดยใช้ระบบตัวพา คือ 20% EtOAc:Hexane, 30% EtOAc:Hexane และ 40% EtOAc:Hexane ผลการตรวจสอบระบบตัวทำละลาย TLC หาค่า R_f (Rate of flow) ของ องค์ประกอบสารสกัดบอนหอม ดังตารางที่ 4-6

ตารางที่ 4-6 ค่า R_f ระบบตัวทำละลาย ของสารสกัดบอนหอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล

ระบบตัวทำละลาย	ค่า R_f ของสกัดบอนหอม	
	CRH1	CRH2
20% EtOAc:Hexane	-	0.38
30% EtOAc:Hexane	-	0.65
40% EtOAc:Hexane	-	-

<u>หมายเหตุ</u> - คือ มองไม่เห็นจุดของสารบนแผ่น TLC ที่ส่องผ่านแสง UV

ในการทดลองพบว่าระบบที่เหมาะสมที่สุด คือ 30% EtOAc:Hexane ทั้งนี้ เนื่องจากระบบ 20% EtOAc:Hexane สารถูกตัวทำละลายพาขึ้นไป ในระยะทางที่ต่ำ มีค่า R_f ค่อนข้างต่ำ และ 40% EtOAc:Hexane สารถูกชะขึ้นไปเป็นแถบอยู่ที่ด้านบนของแผ่น TLC จึงเป็นระบบที่ไม่เหมาะสมในการเลือกมาทดสอบสารต่อไป

ในการวิจัยเพื่อตรวจหาจำนวนองค์ประกอบของสารในสารสกัดบอนหอม เมื่อนำมาหาระบบตัวพา ในการแยกสารด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography พบว่า ระบบตัวพา ที่แยกองค์ประกอบของสารได้ดีที่สุด มีดังนี้ การกลั่นด้วยน้ำใช้ระบบตัวทำละลาย 5% EtOAc: Hexane การสกัดด้วยซอกห์เลต (เอทานอล) และสกัดด้วยซอกห์เลต (เอกเซน) ใช้ระบบ 20% EtOAc: Hexane การสกัดด้วยเอทานอล ใช้ระบบบ 2% MeOH:Hexane และการสกัดด้วยวิธี Partition สารสกัดหยาบเอทานอล ใช้ระบบ 30% EtOAc:Hexane ทั้งนี้ในวิจัยเป็นการทดสอบหาองค์ประกอบ

ของสารเชิงคุณภาพเท่านั้น และระบบที่เหมาะสมในแต่ละวิธีการสกัดจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบ ในการหากลุ่มสารของสารสกัดบอนหอมและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC) ต่อไป

การวิเคราะห์หากลุ่มสารที่เป็นองค์ประกอบในพืชโดย TLC นี้เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็วใช้เครื่องมือน้อย และวิธีการตรวจสอบค่อนข้างจำเพาะ การวิเคราะห์ด้วย TLC สามารถแยกสารและตรวจสอบสารไปพร้อมกันโดยสารที่มีปริมาณมากจะปรากฏแถบสารเป็นวงกว้าง ทั้งยังสามารถประมาณสภาพมีขั้ว (polarity) ของสารจากค่า R_f (R_f = ระยะทางที่สารเคลื่อนไป/ระยะทาง 8 ซม. ที่น้ำยาแยกเคลื่อนที่ไป) สารที่มีค่า R_f ต่ำจะมีขั้ว (Polar) ส่วนสารที่มีค่า R_f สูง จะไม่มีขั้ว (Non-polar) ซึ่งใช้เป็นแนวทางสำหรับการแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพรด้วย column chromatography (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2550)

4.2.2 การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดบอนหอม โดยเทคนิคโครมาโทรกราฟฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

การวิเคราะห์หากลุ่มสารที่มีความสำคัญทางพฤษเคมีต้นบอนหอม (*H.rostrata* Griff.) โดยการใช้เทคนิค TLC และทำการตรวจสอบด้วยน้ำยาที่ทำให้เกิดสี โดยทำการทดสอบกลุ่มสารต่าง ๆได้แก่ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยทดสอบด้วยน้ำยา 1% $AlCl_3$ ทดสอบสารกลุ่มฟีนอล น้ำตาล สเตอรอยด์ และเทอร์พีน ด้วยน้ำยา *p*-anisalaldehyde ทดสอบสารกลุ่มไนโตรเจน แอลคาลอยด์ด้วยน้ำยา Dragendroff และทำการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วย DPPH และทำการวัดค่า R_f ของจุดสารที่เกิดปฏิกิริยากับน้ำยาประเภทต่าง ๆ ที่ใช้ทดสอบ (ดังแสดงในภาคผนวก ง และภาคผนวก จ) พบว่าส่วนสกัดต่าง ๆ ทำนำมาทดสอบกับน้ำยาต่าง ๆ แสดงผลดังตารางที่ 4-7, 4-8

ตารางที่ 4-7 ผลการทดสอบกลุ่มสารต่าง ๆ และการต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดบอนหอมด้วยวิธีโครมาโทรกราฟฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

วิธีการสกัด	ส่วนสกัดบอนหอม	ทดสอบกลุ่มสาร/สเปรย์รีเอเจนท์			
		ฟลาโวนอยด์ (1%$AlCl_3$)	ฟีนอล/น้ำตาล/สเตอรอยด์/เทอร์พีน (*p*-anisalaldehyde)	ไนโตรเจน/แอลคาลอยด์ (Dragendroff)	การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH)
กลั่นด้วยน้ำ	ราก (AR)	-	++	-	+
	เหง้า (ARH)	-	+++	-	+
	ลำต้น (AS)	-	++	-	+
	ใบ (AL)	-	+	-	+++
สกัดด้วยซอกห์เลต (เอทานอล)	ราก (BR1)	-	++	-	+
	เหง้า (BRH1)	-	+++	-	+
	ลำต้น (BS1)	-	+	-	+
	ใบ (BL1)	-	+	-	+
สกัดด้วยซอกห์เลต (เฮกเซน)	ราก (BR2)	-	++	-	+
	เหง้า (BRH2)	-	+++	-	+
	ลำต้น (BS2)	-	+	-	+
	ใบ (BL2)	-	++	-	+
สกัดด้วยเอทานอล	เหง้า (CRH)	-	+++	+++	+++
	ลำต้น (CS)	-	+	++	++
วิธีPartition	เหง้า (CRH1)	-	+++	-	+++
	เหง้า (CRH2)	-	++	-	++

หมายเหตุ (-) Negative test, (+) Weak positive test, (++) Positive test, (+++) Strongly positive test

ตารางที่ 4.8 ค่า R_f ของการทดสอบกลุ่มสารต่าง ๆ และการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดบอนหอม

วิธีการสกัด	ส่วนสกัดบอนหอม	ค่า R_f ของการทดสอบกลุ่มสาร/สเปรย์รีเอเจนท์			
		ฟลาโวนอยด์ (1%$AlCl_3$)	ฟีนอล/น้ำตาล/สเตอรอยด์/เทอร์พีน (*p*-anisalaldehyde)	ไนโตรเจน/แอลคาลอยด์ (Dragendroff)	การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH)
กลั่นด้วยน้ำ	ราก (AR)	-	0.18, 0.46	-	0
	เหง้า (ARH)	-	0.04, 0.08, 0.18, 0.33, 0.38, 0.50	-	0
	ลำต้น (AS)	-	0.05, 0.18, 0.19	-	0
	ใบ (AL)	-	0.05, 0.18, 0.21	-	0.19, 0.21
ซอกห์เลต (เอทานอล)	ราก (BR1)	-	0.16, 0.54	-	0
	เหง้า (BRH1)	-	0.05, 0.10, 0.13, 0.18, 0.21, 0.25, 0.34, 0.38, 0.45, 0.56, 0.65, 0.75	-	0
	ลำต้น (BS1)	-	0.56	-	0
	ใบ (BL1)	-	0.55	-	0
ซอกห์เลต (เฮกเซน)	ราก (BR2)	-	0.05, 0.08, 0.11, 0.15, 0.30, 0.40, 0.52, 0.55, 0.73, 0.8	-	0
	เหง้า (BRH2)	-	0.05, 0.08, 0.10, 0.13, 0.15, 0.28, 0.43	-	0
	ลำต้น (BS2)	-	0.05, 0.08, 0.26, 0.43	-	0
	ใบ (BL2)	-	0.06, 0.08, 0.28, 0.53,	-	0

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

วิธีการสกัด	ส่วนสกัดบอนหอม	ค่า R_f ของการทดสอบกลุ่มสาร/สเปรย์รีเอเจนท์			
		ฟลาโวนอยด์ (1%$AlCl_3$)	ฟีนอล/น้ำตาล/สเตอรอยด์/เทอร์พีน (*p*-anisalaldehyde)	ไนโตรเจน/แอลคาลอยด์ (Dragendroff)	การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH)
สกัดด้วยเอทานอล	เหง้า (CRH)	-	0.05, 0.09, 0.38, 0.46, 0.65	0.95	0.23
	ลำต้น (CS)	-	-	095	0
วิธีPartition	เหง้า (CRH1)	-	0.04, 0.08, 0.15, 0.21, 0.28, 0.33	-	0
	เหง้า (CRH2)	-	0.03, 0.06, 0.20, 0.22, 0.31	-	0

<u>หมายเหตุ</u> (-) Negative test, (0) baseline

ในการทดสอบกลุ่มสารฟลาโวนอยด์ โดยใช้น้ำยา 1% $AlCl_3$ สารสกัดบอนหอมทุกส่วนสกัดและทุกวิธีการสกัดไม่มีการเกิดปฏิกิริยากับ 1% $AlCl_3$ แสดงว่าสารสกัดบอนหอมไม่มีกลุ่มสารพวกฟลาโวนอยด์

ในการทดสอบกลุ่มสารพวกฟีนอล น้ำตาล สเตอรอยด์ และเทอร์พีนด้วยน้ำยา *p*-anisalaldehyde sulfuric acid ให้แถบสีม่วง ม่วงแดง น้ำเงิน เขียว ในวิธีการสกัดด้วยน้ำส่วนเหง้า (ARH) พบมากที่สุด จำนวน 6 ตำแหน่ง ราก (AR) 2 ตำแหน่ง ลำต้น (AS) 3 ตำแหน่ง และใบ (AL) 3 ตำแหน่ง ตามลำดับ วิธีการสกัดแบบซอกห์เลต โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายพบว่าส่วนเหง้า (BRH1) จำนวน 12 ตำแหน่ง ราก (BR1) 2 ตำแหน่ง ลำต้น (BS1) 1 ตำแหน่ง และใบ (BL1) 1 ตำแหน่ง ตามลำดับ วิธีการสกัดแบบซอกห์เลตโดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน พบว่าส่วนเหง้า (BRH2) 7 ตำแหน่ง ราก (BR2) 10 ตำแหน่ง ลำต้น (BS2) 4 ตำแหน่ง และใบ (BL2) 4 ตำแหน่ง ตามลำดับ (ดังภาคผนวก ง) วิธีการสกัดด้วยเอทานอล พบว่าในส่วนสกัดเหง้า (CRH) มีทั้งหมด 5 ตำแหน่ง ส่วนส่วนสกัดลำต้น (CS) ไม่พบกลุ่มสารกลุ่มนี้ ซึ่งการการทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้

ว่าสารสกัด บอนหอมประกอบด้วยสารกลุ่มสเตอรอยด์และเทอร์ปีนส์ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง สเตอรอยด์และเทอร์ปีนส์ได้ด้วย TLC (บุปผาชาติ พตด้วง และคณะ, หน้า 19-23)

การทดสอบกลุ่มสารไนโตรเจนและอัลคาลอยด์ จากสารสกัดบอนหอมเมื่อพ่นด้วยน้ำยาดราเจนดอร์ฟ (Dragendroff) พบว่า การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล เมื่อพ่นด้วยน้ำยาดราเจนดอร์ฟ (Dragendroff) จะให้แถบสีเหลืองเป็นเส้น ๆ ตรงตำแหน่งข้างบนแผ่น TLC ซึ่งบ่งบอกว่าพบสารพวกไนโตรเจนและอัลคาลอยด์ ส่วนวิธีการสกัดด้วยน้ำ สกัดแบบซอกห์เลต ด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเฮกเซน ไม่พบสารกลุ่มไนโตรเจนและอัลคาลอยด์ จากผลการทดลองที่วิเคราะห์พบว่าในแต่ละวิธีการสกัดให้ผลการทดสอบที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ในการทดสอบสารสกัดหยาบเอทานอลที่พบกลุ่มสารไนโตรเจนและอัลคาลอยด์นั้น อาจเกิดจากสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลได้สารหลายชนิดปนกัน เกิดการจับกันย่างหลวม ๆ ทำให้การละลายของสารแตกต่างออกไปจากคุณสมบัติในการละลายของสารสกัดแต่ละชนิด ซึ่งในการหาตัวทำละลายที่สมบูรณ์ที่สามารถสกัดสารได้ทุกชนิด ส่วนใหญ่นิยมใช้แอลกอฮอล์หรือส่วนผสมของแอลกอฮอล์และน้ำ เนื่องจากสามารถละลายได้ทั้งสารมีขั้ว (polar) และไม่มีขั้ว (non-polar) แม้ไม่ใช่ตัวทำละลายที่ดีที่สุดของทุกกลุ่ม แต่ก็สามารถสกัดได้มากกลุ่มและจำนวนมากพอที่จะทำการตรวจสอบเบื้องต้นได้ (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2550) ทำให้การวิเคราะห์พบสารกลุ่มนี้ ส่วนวิธีการสกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายเอทานอล ซึ่งได้ผลแตกต่างจากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลนั้นอาจเกิดจากความร้อนที่ใช้ในการสกัดสาร มีผลทำให้สารที่ได้แตกต่างกันออกไป ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองเพื่อยืนยันผลทดสอบอีกครั้งโดยการนำสารสกัดหยาบเอทานอลไปทำการ สกัดด้วยวิธี Partition สารสกัดหยาบเอทานอลในชั้นเฮกเซน ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วต่ำ และชั้นเอทิลอะซิเตต ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูง เพื่อแยกองค์ประกอบของสารให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น โดยได้เลือกส่วนสกัดส่วนเหง้า (CRH) เพราะให้ผลการวิเคราะห์ในการพบกลุ่มสารไนโตรเจนและอัลคาลอยด์และให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่าส่วนสกัดลำต้น (CS) และผลการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดที่ทำการ Partition เมื่อนำมาทดสอบกลุ่มสารไนโตรเจนและอัลคาลอยด์ ไม่พบสารกลุ่มนี้ จึงสามารถวิเคราะห์ได้ว่าส่วนสกัดบอนหอมที่สกัดโดยวิธีกลั่นด้วยน้ำ สกัดแบบซอกห์เลต และการ Partition สารสกัดหยาบเอทานอล ไม่มีสารกลุ่มในโตรเจนและอัลคาลอยด์เป็นส่วนประกอบ ส่วนการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีสารกลุ่มไนโตรเจนและอัลคาลอยด์เป็นส่วนประกอบทั้งส่วนเหง้าและลำต้น และจากการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่สกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายเอทานอล กับการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบสารองค์ประกอบที่เหมือนกัน คือ กลุ่มสารพวกฟีนอล น้ำตาล สเตอรอยด์ เทอร์พีน

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยน้ำยา DPPH พบว่าทุกส่วนสกัดของบอนหอมทุกวิธีการสกัดให้ผลการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจากการทดลอง พบว่า วิธีการสกัดด้วยน้ำส่วนใบ (AL) พบมากที่สุด จำนวน 2 ตำแหน่ง และวิธีการสกัดด้วยเอทานอลส่วนเหง้า (CRH) 1 ตำแหน่ง ส่วนวิธีการสกัดด้วยน้ำ การสกัดแบบซอกห์เลต โดยใช้เอทานอล และเฮกเซนเป็นตัวทำละลาย และสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ในส่วนสกัดต่าง ๆ ของบอนหอม มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทุกส่วน แต่เกิดการฟอกจางสี DPPH ที่ตำแหน่งค่า R_f เท่ากับศูนย์ นั่นคือ ณ ตำแหน่งจุด spot สารสกัด และจากการทดลอง พบว่า ส่วนสกัดที่สกัดด้วยไอน้ำส่วนใบ (AL) และส่วนสกัดหยาบเอทานอลส่วนเหง้า (CRH) มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิระ DPPH ใกล้เคียงกันมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดหยาบเอทานอลส่วนลำต้น (CS) และสารสกัดที่ Partition ในชั้นเอทิลอะซิเตตให้ผลการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน

จากการวิเคราะห์แถบสีบนแผ่น TLC ของส่วนสกัดบอนหอม พบว่าบอนหอมมีองค์ประกอบเคมีเป็นกลุ่มสารที่มีความสำคัญทางเภสัชวิทยา คือ สเตอรอยด์ เทอร์ปีนส์ และอัลคาลอยด์ ซึ่งจะทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารกลุ่มนี้ต่อไปโดยเทคนิค GC/MS ส่วนการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จะนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดบอนหอมต่อไป โดยเลือกส่วนสกัดบอนหอมส่วนใบที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำสารสกัดหยาบเอทานอลส่วนเหง้า (CRH) สารสกัดหยาบเอทานอลส่วนใบ (AL) และสารสกัดหยาบเอทานอลส่วนลำต้น (CS) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากที่สุดมาทำการวิเคราะห์โดยเทคนิคสเปกโทรสโกปี

4.3 การทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อนำสารสกัดบอนหอมส่วนใบ ที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ (AL) สารสกัดส่วนเหง้า (CRH) และส่วนลำต้น (CS) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล มาทำการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH โดยนำมาเตรียมเป็นสารละลายที่ช่วงความเข้มข้น 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4-9 ซึ่งในการทดสอบร้อยละการยับยั้งของสารสกัดบอนหอมด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ และสกัดด้วยตัวทำละลาย พบว่า ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน มีผลทำให้ร้อยละการยับยั้งมีค่าต่างกัน ซึ่งร้อยละการยับยั้งจะแปรผันตามความเข้มข้น คือ ที่ความเข้มข้นสูง ร้อยละการยับยั้งจะสูงตามด้วย แต่จะเริ่มคงที่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น ดังแสดงตามตาราง 4-9 และภาพที่ 4-1 และจะเริ่มคงตัวเมื่อความเข้มข้นเข้าใกล้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH)

จากการทดสอบพบว่าทุกสารสกัดมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้น้อย และมีความสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันคือ ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น ทุกช่วงความเข้มข้น จากความเข้มข้นสูงสุด คือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดทุกส่วนมีค่าร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ซึ่งความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH ที่แสดงโดยค่าร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดบอนหอม พบว่าสารสกัดส่วนเหง้า (CRH) ที่สกัดด้วยเอทานอล มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ได้ดีกว่าสารสกัดจากบอนหอมส่วนใบที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ (AL) และสารสกัดบอนหอมส่วนลำต้น (CS) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล คือ 28.39±0.0001, 23.76±0.0002 และ 1.85±0.0001 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 4-9

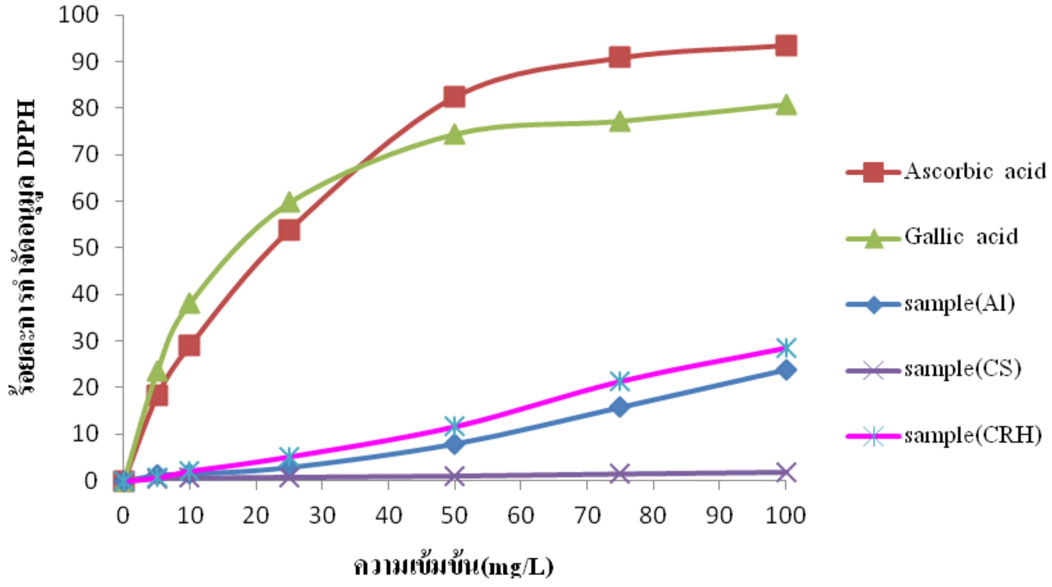
ตารางที่ 4-9 ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดบอนหอม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดบอนหอม			ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐาน	
	AL	CS	CRH	Ascorbic acid	Gallic acid
5	1.26 ±0.0001	0.56±0.0001	0.67±0.0001	2.80±0.0003	23.46±0.0007
10	1.56±0.0001	0.65±0.0001	2.10±0.0002	15.77±0.0053	38.27±0.0001
25	2.94±0.0001	0.82±0.0001	5.20±0.0002	45.25±0.0018	59.77±0.0003
50	7.95±0.0001	1.07±0.0001	11.62±0.0002	79.21±0.0002	74.50±0.0001
75	15.77±0.0001	1.50±0.0001	21.29±0.0000	89.14±0.0001	77.28±0.0001
100	23.76±0.0002	1.85±0.0001	28.39±0.0001	92.27±0.0003	80.85±0.0001

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งเป็นอิสระต่อกัน แต่ทำการทดลองทำ 3 ซ้ำ

เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 2 ชนิด ที่ช่วงความเข้มข้นเดียวกัน (5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่า สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของบอนหอม มีค่าร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ต่ำกว่าของสารมาตรฐาน Ascorbic acid และ Gallic acid ซึ่งมีค่าร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ดังแสดงในตาราง 4-9 และเมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าสารสกัดบอนหอมจากส่วนต่าง ๆ มีค่าร้อยละการต้านอนุมูล DPPH น้อยมากเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Ascorbic acid และ Gallic

acid ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในสารสกัดมีสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่หลายชนิด แต่มีองค์ประกอบบางชนิดเท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH ของสารจะรายงานในรูปของค่า IC_{50}



ภาพที่ 4-1 ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดบอนหอม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

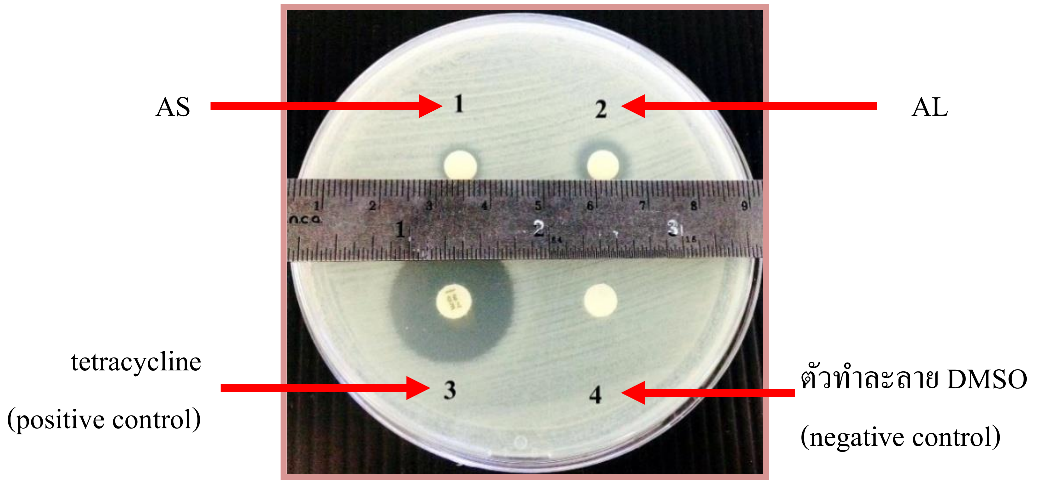
ค่าความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH ของสารจะแสดงในรูปของค่า IC_{50}ซึ่งคือค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถดักจับอนุมูล DPPH ได้ร้อยละ 50 หากค่า IC_{50} ของสารสกัดตัวใดมีค่าสูงแสดงว่ามีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำ หากค่า IC_{50} ของสารสกัดตัวใดมีค่าต่ำแสดงว่ามีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง แต่ทั้งนี้เนื่องจากร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดบอนหอม AL CRH และ CS มีค่าไม่ถึงร้อยละ 50 จึงไม่สามารถนำมาหาค่า IC_{50} และค่า IC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid และ Gallic acid มีค่าเท่ากับ 24.59 และ 17.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ช)

จึงสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดบอนหอมส่วนรากที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (CRH) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดบอนหอมส่วนใบที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ (AL) และสารสกัดบอนหอมส่วนต้นที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (CS) ตามลำดับ แต่เมื่อเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระกับสารมาตรฐาน พบว่า สารสกัดบอนหอม CRH

และ AL มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน แต่สารสกัดบอนหอมก็ยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระน้อยมาก

4.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย

เมื่อนำสารสกัดบอนหอมมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* เทียบกับสารมาตรฐาน Tetracycline และ DMSO ดังตัวอย่างภาพที่ 4-2



ภาพที่ 4-2 ภาพแสดงตัวอย่างการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ATCC 11778 ของสารสกัดบอนหอมที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ ส่วนลำต้น (AS) และส่วนใบ (AL)

จากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นของบอนหอม จำนวน 14 ตัวอย่าง ให้ผลดังตารางที่ 4-11 และภาพที่ 1-19 (แสดงในภาคผนวก ซ) ซึ่งพบว่าสารสกัดบอนหอมจำนวน 5 ตัวอย่าง สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยสาร AR, ARH, AS, AL และ BRH1 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Bacillus cereus* นอกจากนี้ยังพบว่า AL สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* เมื่อเปรียบเทียบขนาด inhibition zone พบว่า AL มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียสูงที่สุด ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Escherichia coli* พบว่า สารสกัดบอนหอมทุกชนิดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดนี้ โดยไม่เกิด inhibition zone

ตารางที่ 4-10 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดบอนหอม

แบคทีเรียทดสอบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (มิลลิเมตร) ± SD*									
	AR	ARH	AS	AL	BR1	BRH1	BS1	BL1	Tetracycline (30µl/disc)	DMSO (20µl/disc)
S. aureus	-	-		8.67 ± 1.155	-	-	-	-	27.67 ± 0.577	-
B. cereus	7.3 3± 0.577	7.00 ± 0.000	7.33±0.577	8.67 ± 1.155	-	7.33 ± 0.577	-	-	23.67 ± 0.577	-
E. coli	-	-	-	-	-	-	-	-	26.33 ± 0.577	-

<u>หมายเหตุ</u> : - หมายถึง ไม่มี inhibition zone

* หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ตารางที่ 4-10 (ต่อ)

แบคทีเรียทดสอบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (มิลลิเมตร) ± SD*						
	BRH2	BS2	BL2	CRH	CS	Tetracycline (30µl/disc)	DMSO (20µl/disc)
S. aureus	-	-	-	-	-	27.67 ± 0.577	-
B. cereus	-	-	-	-	-	23.67 ± 0.577	-
E. coli	-	-	-	-	-	26.33 ± 0.577	-

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่มี inhibition zone

* หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

จากตารางการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar Disc Diffusion พบว่าสารสกัดบอนหอมในทุก ๆ ตัวอย่างมีปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อแผ่น (10 μl/disc) มีสารสกัดจำนวน 5 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus* และ *B. cereus* โดยมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *B. cereus* ได้ดีกว่า โดยเทียบกับสารควบคุม คือ DMSO และ Tetracycline โดยอาจเกิดจากความเข้มข้นของสารสกัดที่มีปริมาณน้อยเกินไปหรืออาจเกิดจากตัวทำละลายที่ใช้ ทำให้คุณสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเปลี่ยนแปลงไป ฤทธิ์ในการยับยั้งแตกต่างกันมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับสารที่ใช้ในการกลั่น เทคนิควิธีการกลั่น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ กฤติกา นรจิตร (2548)

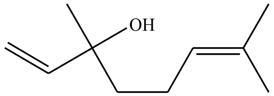
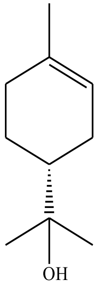
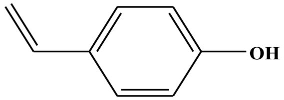
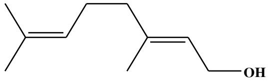
จากการวิจัยนี้ พบว่าส่วนสกัดใบที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ (AL) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ เช่น การถนอมอาหาร ที่มีองค์ประกอบของไขมัน เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ใช้เป็นส่วนผสมในการทำเครื่องสำอาง และสามารถพัฒนาเป็นยารักษาโรคที่มีสาเหตุจากอนุมูลอิสระ เช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็ง และโรคความจำเสื่อม เป็นต้น

4.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของ สารสกัดบอนหอมส่วนใบ ด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี

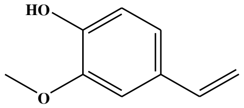
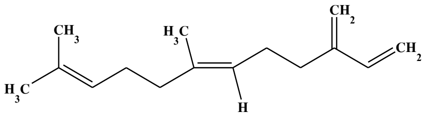
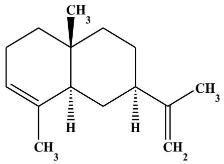
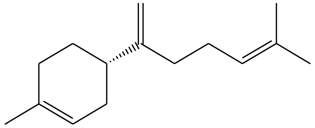
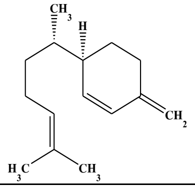
จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดบอนหอม พบว่า สารสกัดบอนหอมส่วนเหง้า (CRH) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด รองลงมา คือ ส่วนใบ (AL) และจากการวิเคราะห์ฤทธิ์ทางต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดส่วนใบที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ (AL) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบขนาด inhibition zone พบว่า AL มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียสูงที่สุด

อีกทั้งส่วนใบคือส่วนที่ชาวบ้านนิยมนำมารับประทาน โดยนำมาเป็นส่วนผสมในอาหาร จึงมีความสนใจที่จะนำสารสกัดบอนหอมส่วนใบที่กลั่นด้วยน้ำ (AL) มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/MS เพื่อหาองค์ประกอบทางเคมี โดยตัวอย่างโครมาโทแกรมแสดงดังภาพที่ 4-2, 4-3 และองค์ประกอบทางเคมี แสดงในตารางที่ 4-11

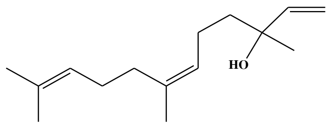
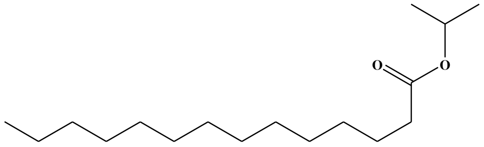
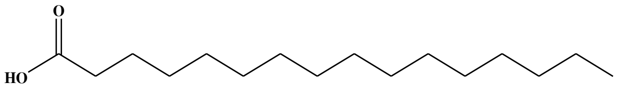
ตารางที่ 4-11 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดบอนหอม (AL) ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี

Retention Time (minute)	% of total	% Quality	Library Name (Wiley 7N edition)	Activity	สูตรโครงสร้างทางเคมี
15.02	2.21	97	Linalool	-	
18.77	1.25	91	α-Terpineol	-	
20.46	1.09	86	4-Vinylphenol	Antioxidant	
20.86	1.74	95	trans- Geraniol	-	

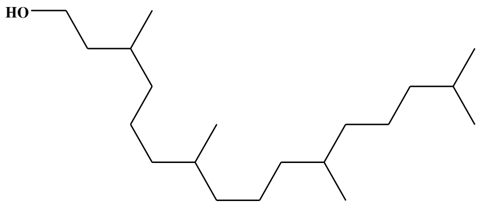
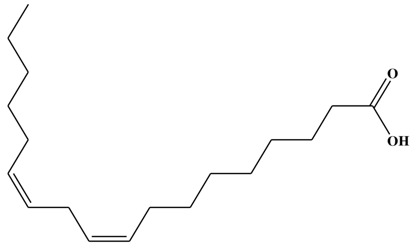
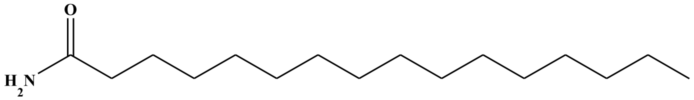
ตารางที่ 4-11 (ต่อ)

Retention Time (minute)	% of total	% Quality	Library Name (Wiley 7N edition)	Activity	สูตรโครงสร้างทางเคมี
23.18	1.34	96	4-vinylguaiacol	Antioxidant	
27.73	2.69	98	trans-β-Farnesene	-	
29.20	0.68	99	α-Selinene	-	
29.53	0.90	98	β-Bisabolene	-	
30.07	1.08	99	β-Sesquiphellandrene	-	

ตารางที่ 4-11 (ต่อ)

Retention Time (minute)	% of total	% Quality	Library Name (Wiley 7N edition)	Activity	สูตรโครงสร้างทางเคมี
31.28	1.16	91	Nerolidol	-	
35.31	63.38	-	Unknown	-	
38.94	0.91	99	Isopropyl Myristate	-	
43.31	3.79	99	Palmitic acid	Antioxidant	

ตารางที่ 4-11 (ต่อ)

Retention Time (minute)	% of total	% Quality	Library Name (Wiley 7N edition)	Activity	สูตรโครงสร้างทางเคมี
46.27	0.84	96	Phytol	Antioxidant	
47.59	2.24	95	Linoleic acid	-	
48.77	1.49	97	Hexadecanamide	-	

จากการวิเคราะห์พบว่าในบอนหอมส่วนใบ (AL) มีสารองค์ประกอบ 52 ชนิด สาร 10 องค์ประกอบแรกที่มีปริมาณสูงสุด ได้แก่ Palmitic acid (3.79%) trans-β-Farnesence (2.69%) Linoleic acid ๖2.24%) Linalool (2.21%) trans-Geraniol (1.74%) Hexadecanamide (1.49%) 4-Vinylguaiacol (1.34%) α-Terpineol (1.25%) Nerolidol (1.16%) และ 4-Vinylphenol (1.09%) และพบสารตัวอย่างที่ไม่ทราบชื่อ (Unknown) ปริมาณมาก (63%) ดังแสดงในตารางที่ 4-12 และจากผลการวิเคราะห์โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟฟี/แมสสเปกโทรโฟโทเมตรี (GC/MS) พบว่าสารองค์ประกอบในใบส่วนใหญ่เป็นสารพวก Monoterpenes ได้แก่ Linalool, α-Terpineol, trans-Geraniol (Monoterpenoids) คิดเป็น 5.20% สารพวก Sesquiterpene ได้แก่ Nerolidol, α-Selinene, β-Bisabolene, β-Sesquiphellandrene, Trans-β-Farnesene คิดเป็น 6.51 % สารพวก Diterpene ได้แก่ Phytol คิดเป็น 0.84 % กลุ่ม Phenolic ได้แก่ 4-vinylguaiacol, 4-Vinylphenol คิดเป็น 2.43% สารพวกไขมัน ได้แก่ Linoleic acid, Palmitic acid คิดเป็น 6.03 % และอื่นๆ ได้แก่ Hexadecanamide, Isopropyl Myristate คิดเป็น 2.40 %

จากผลการทดลองเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยของ Wong et al. (2006) มีความสอดคล้องกันโดยพบว่ามีองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากส่วนใบ 59 ชนิด โดยน้ำมันหอมระเหยจากส่วนใบส่วนใหญ่เป็นสารพวก Monoterpene hydrocarbons คิดเป็น 51.6% นั่น คือ α-pinene (22%) และ β-Pinene (17.2%) และสารพวก Sesquiterpenoidsgermacrene D (5.9%), α-selinene (4.1%), α-humulene (3.9%) และ neointermedeol (6.5%)

ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดบอนหอม ทำให้ทราบว่าในสารสกัดบอนหอม (AL) สารที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ มีจำนวน 4 ชนิด คือ Palmitic acid (3.79%), 4-vinylguaiacol (1.34%), 4-Vinylphenol (1.09%) และ Phytol (0.84%) ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณสารอยู่น้อย ดังนั้นการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดบอนหอมจึงมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้น้อยมาก

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

ผลการสกัดส่วนราก เหง้า ลำต้น และใบของบอนหอม (*H.rostrata* Griff.)โดยใช้วิธีการสกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ การสกัดแบบซอกห์เลต โดยใช้ตัวทำละลาย เอทานอลและเฮกเซน และวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล เพื่อศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียบางชนิด และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดบอนหอม สามารถสรุปได้ดังนี้

1. ปริมาณส่วนสกัดบอนหอมส่วนราก เหง้า ลำต้น และใบ ด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ คิดเป็นร้อยละ 0.02, 0.09, 0.01, 0.03 ด้วยวิธีการสกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายเอทานอล คิดเป็นร้อยละ 1.74, 1.90, 1.53, 1.70 ด้วยวิธีการสกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายเฮกเซน คิดเป็นร้อยละ 1.97, 2.34, 1.85, 1.92 ตามลำดับ สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลส่วนเหง้า คิดเป็นร้อยละ 3.99 และส่วนลำต้น คิดเป็นร้อยละ 2.07 และทำการสกัดด้วยวิธี Partition ส่วนเหง้าของสารสกัดหยาบ เอทานอล ในชั้นเฮกเซนและเอทิลอะซิเตต คิดเป็นร้อยละ 1.81 และ 0.82 ตามลำดับ

2. ระบบตัวพา ที่แยกองค์ประกอบของสารได้ดีที่สุด มีดังนี้ การกลั่นด้วยน้ำ ใช้ระบบตัวทำละลาย 5% EtOAc:Hexane การสกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายเอทานอล การสกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายเฮกเซนใช้ระบบ 20% EtOAc:Hexane การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ใช้ระบบบ 2% MeOH:Hexane และการสกัดด้วยวิธี Partition สารสกัดหยาบเอทานอลใช้ระบบ 30% EtOAc:Hexane

3. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลุ่มสาร โดยวิเคราะห์แถบสีบนแผ่น TLC ของสารสกัดบอนหอม พบว่าบอนหอมมีองค์ประกอบเคมีเป็นกลุ่มสารที่มีความสำคัญทางเภสัชวิทยา คือ สเตอรอยด์ เทอร์ปีนส์ และอัลคาลอยด์ ส่วนการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดบอนหอมส่วนใบที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ (AL) สารสกัดหยาบเอทานอลส่วนเหง้า (CRH) และสารสกัดหยาบเอทานอลส่วนลำต้น (CS) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากที่สุด

4. ผลการตรวจสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดบอนหอมส่วนเหง้าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (CRH) สารสกัดบอนหอมส่วนใบที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ (AL) และ สารสกัดบอนหอมส่วนต้นที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (CS) โดยใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปี พบว่า สารสกัดบอนหอมมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น โดยสารสกัดบอนหอมส่วนเหง้าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (CRH) มีความสามารถในการต้านอนุมูล

อิสระสูงสุด คือ 28.39±0.0001 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ สารสกัดบอนหอมส่วนใบที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ (AL) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 23.76±0.0002 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดบอนหอมส่วนต้นที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (CS) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 1.85±0.0001ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระกับสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัด CRH, AL, CS มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่ต่ำกว่าสารมาตรฐาน Ascorbic acid และ Gallic acid ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 92.27±0.0003 และ 80.85 ±0.0001 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่า IC_{50} (24.59 และ 17.63 ตามลำดับ) บ่งบอกได้ว่าสารสกัดบอนหอมมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระน้อยมาก

5. ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar Disc Diffusion โดยทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* เทียบกับสารมาตรฐาน Tetracycline และ DMSO พบว่าสารสกัดบอนหอมจำนวน 5 ตัวอย่าง สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยสาร AR, ARH, AS, AL และ BRH1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus cereus* ATCC 11778 นอกจากนี้ยังพบว่า AL สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Escherichia coli* พบว่าสารสกัดบอนหอมทุกชนิดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดนี้ เมื่อเปรียบเทียบขนาด inhibition zone พบว่า AL มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียสูงที่สุด

6. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดบอนหอมส่วนใบด้วยการกลั่นด้วยน้ำ (AL) โดยเทคนิค GC/MS พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีทั้งหมด 52 ชนิด สารองค์ประกอบในใบส่วนใหญ่เป็นสารพวก monoterpenes, sesquiterpene , diterpene, phenolic และไขมัน โดยสาร 10 องค์ประกอบแรกที่มีปริมาณสูงสุด ได้แก่ Palmitic acid (3.79%) trans-β-Farnesence (2.69%) Linoleic acid (2.24%) Linalool (2.21%) trans-Geraniol (1.74%) Hexadecanamide (1.49%) 4-Vinylguaiacol (1.34%) α-Terpineol (1.25%) Nerolidol (1.16%) และ 4-Vinylphenol (1.09%) และพบสารตัวอย่างที่ไม่ทราบชื่อ (Unknown) ปริมาณมาก (63%) และตรวจพบสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 4 ชนิด คือ Palmitic acid, 4-vinylguaiacol, 4-Vinylphenol และ Phytol

5.1 ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็นการทดสอบ วิธี DPPH assay เท่านั้น ซึ่งเป็นเพียงส่วนหนึ่งของการทดสอบเท่านั้น ดังนั้นควรมีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในวิธีการอื่น ๆ อีกด้วย

2. ควรศึกษาการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และนำสารบริสุทธิ์ที่ได้มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมี และสารตัวอย่างไม่ทราบชื่อ

3. ในการสกัดควรทดลองเปรียบเทียบโดยใช้พืชที่แห้ง บดให้ละเอียด เทียบกับพืชสด เพื่อทำให้ได้ปริมาณสารสกัดในปริมาณมากที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพานิชย์ต่อไป

4. ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Agar Disc Diffusion สารสกัดที่ได้อาจมีความเข้มข้นน้อยและผ่านการทำให้แห้งด้วย rotary evaporator และเก็บไว้นานจึงทำให้สารสกัดที่ได้มีความเข้มข้นเปลี่ยนไป ดังนั้นในการทดสอบครั้งต่อไปควรมีการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารให้มากขึ้น

บรรณานุกรม

กฤติกา นรจิตร. (2548). คุณสมบัติของสารสกัดจากพืชวงศ์ขิง : อิทธิพลของวิธีการสกัดต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ / กฤติกา นรจิตร. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. (2539). *วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร*. กรุงเทพฯ: คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชนิดา พลานุเวช. (2548) .*สิทธิการิยะ*. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เต็ม สมิตินันทน์. (2523). *ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง).*

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

ปรียนันท์ บัวสด. (2549). *การตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารแอนตี้ออกซิแดนท์ของเครื่องดื่มชาโดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี.* วิทยานิพนธ์ ปริญญาตรีบัณฑิต, นครปฐม, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

พวงรัตน์ ภักดีโชติ. (2543). *การตรวจกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในต้นตำลึงและบัวบก*. รายงานการวิจัยขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พัชรี คล้ายวัฒนะ. (2550). ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากต้นขิงแม่โขง= Antioxidant activities and total phenolic content of extracts from Zingiber mekongense Gagnep. โครงงานวิจัยทางชีวเคมี (วท.บ. (สาขาวิชาชีวเคมี))--มหาวิทยาลัยบูรพา

แม้น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, พลกฤษณ์ แสดงวณิช, ภควดี สุทธิ์ไวยกิจ, มานพ สิทธิเดช, สายสุนีย์ เหลี่ยวเรืองรัตน์, อุมาพร สุขม่วง และวัญเพ็ญ ช้อนแก้ว. (2553). *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2550) .*การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร*.กรุงเทพฯ สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เวียงทอง นุ่นภักดี. (2550). *องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของรากพังคี*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. (2545). *ตำราจุลชีววิทยาทางอาหาร*. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

สุวิมล กีรติพิบูล. (2546). *จุลินทรีย์กับการควบคุมสุขลักษณะการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ ส.ส.ท.สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น).

อภิชัย พรประเสริฐผล. (2555). *การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีววิทยาของส่วนสกัดจาก Colocasia gigantean.* วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิศวกรรมเคมี, คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์. กรุงเทพฯ: กรมป่าไม้.

อรัญญา มโนสร้อย และจีรเดช มโนสร้อย. (2548). *น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากสมุนไพรไทยการใช้ทางยาและเครื่องสำอางค์.* เชียงใหม่: โรงพิมพ์ครองช่าง.

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

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

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

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

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

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

Jarikasem, S., Joseph, Brophy, J., Thubthimthed, S., & Chawananoraset, K. (2010). chemical composition of the essential oil from homalomena aromatica schott rhizome. *Congree on Science and Technology of Thailand, 28,* 738.

Kaneria, M., & Chanda, S. (2012). Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of Manilkara zapota L.(chiku) leaves by sequential soxhlet extraction method. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1526-1533.

Kleyn, J., & Bicknell, M. (1999). *Microbiology Experiments: A Health Science Perspective* (2^{nd} 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.

Zeng, L. B., Zhang, Z. R., Luo, Z. H., & Zhu. J. X. (2011). *Antioxidant activity and chemical constituents of essential oil and extracts of Rhizoma Homalomenae. Food Chemistry Journal*, *125*, 456-463.

Margaill, I. (2005). *Antioxidant strategies in treatment of stroke*. Free radical biology & medicine.

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

Mital Kaneria & Sumitra Chanda. (2012).*Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of Manilkara zapota L.(chiku)leaves by sequential soxhlet extraction method*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, S1526-S1533.

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

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

Policegoudra, R. S., Goswami, S., Aradhya, S. M., Chatterjee, S., Data, S., Sivaswamy, R., Chattopadhyay, P., & Singh, L. (2012). Bioactive constituents of Homalomena aromatic essential oil and its antifungal activity against dermatophytes and yeasts. *Journal de Mycologie Medicale, 22,* 83-87.

Rana, V. S., Pukhrambamb, M., Singh H. B., Verdeguer, M., & BIazquez, M. A. (2010). Essential oil composition of Homalomena aromatica roots. *Asian aroma ingredienst Congress & EXPO*, 43-45.

Jarikasem, S., Brophy, J. J., Thubthimthed, S., & Chawananoraset. K., (2010). *chemical composition of the essential oil from homalomena aromatica schott rhizome.* 28th Congree on Science and Technology of Thailand, 738.

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

Valko, M. (2006). Free radicals metals and antioxidants in oxidative stress-induce cancer. *Chemicobiological Interaction 2006; 160: 1-40.*

Wolf, R. (1998). Vitamin E: the radical protector. *Journal of the European Academic of dermatology and venereology, 10*, 103-107.

Wong, K. C., Lim T. B., & Ali, D. M. H. (2006). Essential oil of Homalomena sagittifolia Jungh. *Flavour and fragrance Journal*, *21*, 786-788.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

รูปส่วนต่าง ๆ ของบอนหอม

รูปส่วนต่าง ๆ ของบอนหอม

ภาพที่ ก-1 ต้นบอนหอม

ภาพที่ ก-2 ต้นบอนหอม

รูปส่วนต่าง ๆ ของบอนหอม

ภาพที่ ก-3 ต้นบอนหอม

ภาพที่ ก-4 รากและเหง้าบอนหอม

รูปส่วนต่าง ๆ ของบอนหอม

ภาพที่ ก-5 เหง้าบอนหอม

ภาพที่ ก-6 ลำต้นบอนหอม

รูปส่วนต่าง ๆ ของบอนหอม

ภาพที่ ก-7 ใบบอนหอม (หน้าใบ)

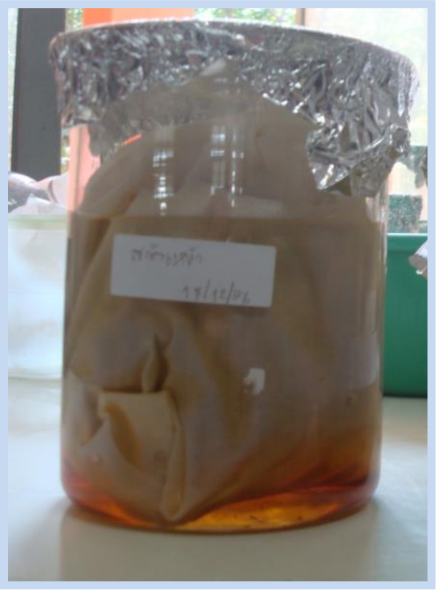
ภาพที่ ก-8 ใบบอนหอม (หลังใบ)

ภาคผนวก ข

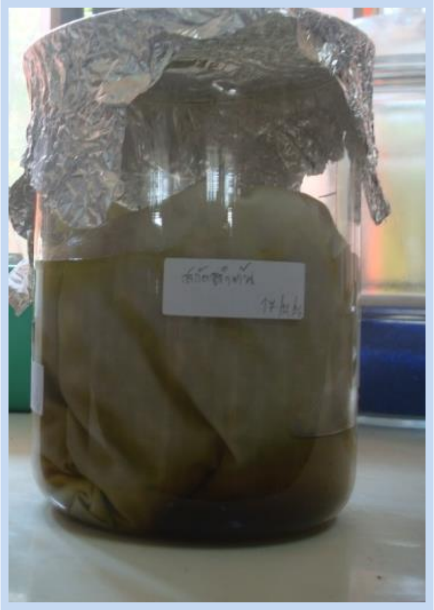
การสกัดสารสกัดบอนหอม

ภาพที่ ข-1 การสกัดบอนหอมด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ

ภาพที่ ข-2 การสกัดบอนหอมด้วยวิธีซอกห์เลต



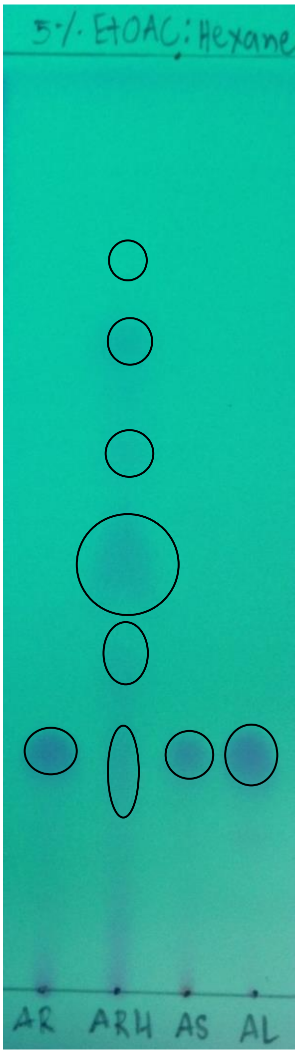
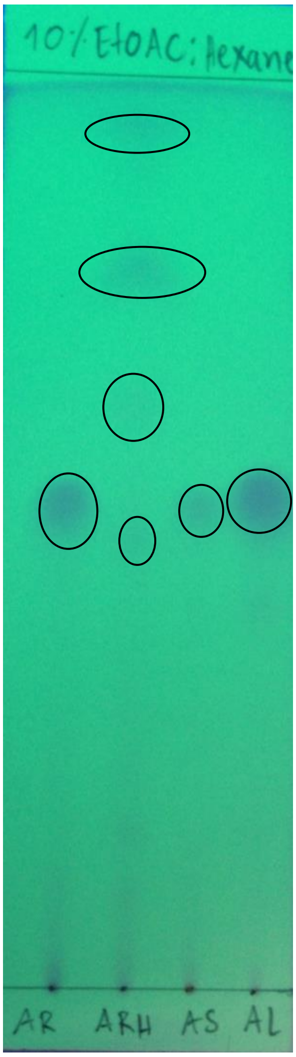
ภาพที่ ข-3 การสกัดบอนหอมส่วนลำต้นด้วยตัวทำละลายเอทานอล



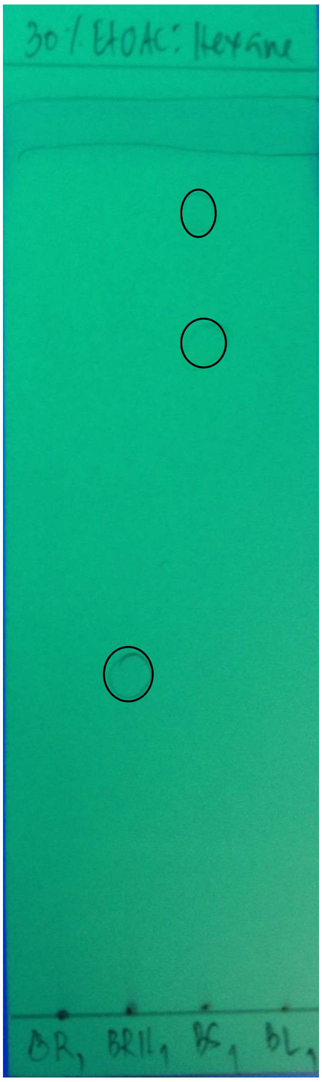
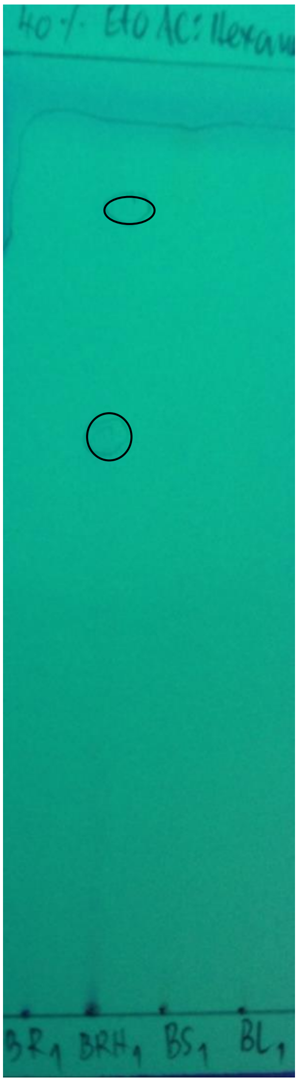
ภาพที่ ข-4 การสกัดบอนหอมส่วนเหง้าด้วยตัวทำละลายเอทานอล

ภาคผนวก ค

ภาพการหาระบบสาร TLC

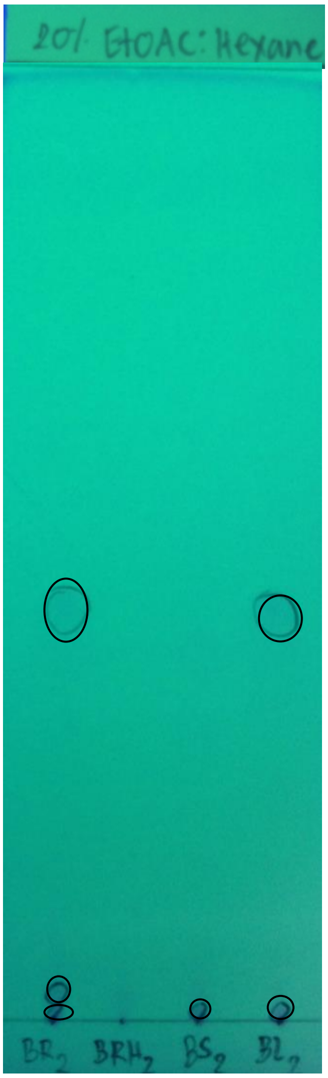
<table>
<tr>
<td>
</td>
<td>
</td>
<td>
</td>
</tr>
<tr>
<td>5% EtOAc:Hexane</td>
<td>10 % EtOAc:Hexane</td>
<td>20% EtOAc:Hexane</td>
</tr>
</table>

ภาพที่ ค-1 การทดสอบ TLC หาระบบการแยกสารสกัดบอนหอมด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ

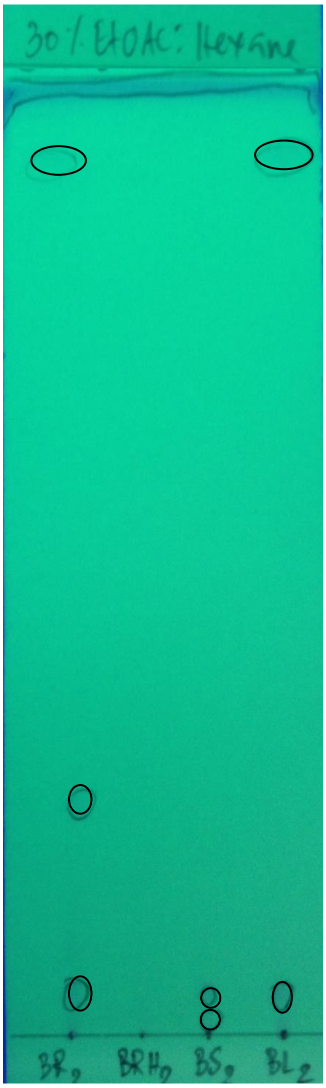
		
20% EtOAc:Hexane	30% EtOAc:Hexane	40% EtOAc:Hexane

ภาพที่ ค-2 การทดสอบ TLC หาระบบการแยกสารสกัดบอนหอมแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลาย
เอทานอล

10% EtOAc:Hexane



20% EtOAc:Hexane



30% EtOAc:Hexane

ภาพที่ ค-3 การทดสอบ TLC หาระบบการแยกสารสกัดบอนหอมแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

ภาคผนวก ง

การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดบอนหอม

โดยเทคนิคโครมาโทรกราฟฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

วิธีการสกัด	1% $AlCl_3$	p-anisalaldehyde sulfuric acid	Dragendoff	DPPH
กลั่นด้วยน้ำ				
ซอกห์เลต (เอทานอล)				

ภาพที่ ง-1 การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดบอนหอม โดยเทคนิค TLC

วิธีการสกัด	1% $AlCl_3$	p-anisalaldehyde sulfuric acid	Dragendoff	DPPH
ซอกห์เลต (เฮกเซน)				
สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล				

ภาพที่ ง-2 การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดบอนหอมโดยเทคนิค TLC

วิธีการสกัด	1% $AlCl_3$	p-anisalaldehyde sulfuric acid	Dragendoff	DPPH
Partition				

ภาพที่ ง-3 การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดบอนหอมโดยเทคนิค TLC

ภาคผนวก จ

ค่า R_f ของการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดบอนหอม

โดยเทคนิค โครมาโทรกราฟฟี แผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

การกลั่นด้วยน้ำ

(ระบบ TLC, 5% EtOAc:Hexane)

สารสกัด	ค่า R_f ของการทดสอบกลุ่มสาร							
	ฟลาโวนอยด์ ($1\%AlCl_3$)		ฟีนอล/น้ำตาล/สเตอรอยด์/เทอร์พีน (P-anisalaldehyde)		ไนโตรเจน/แอลคาลอยด์ (Dragendroff)		การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH)	
	UV	spray	UV	spray	UV	spray	UV	spray
AR	0.19	N.D.	0.18	0.19	0.18	N.D.	0.19	N.D.
	-	-	-	0.46	-	-	-	-
ARH	0.03	N.D.	0.03	0.04	0.04	N.D.	0.04	0.04
	0.05	N.D.	0.06	0.09	0.08	N.D.	0.08	0.08
	0.18	N.D.	0.18	0.19	0.18	N.D.	0.18	0.18
	0.25	N.D.	0.28	0.33	0.28	N.D.	0.28	0.28
	0.35	N.D.	0.36	0.38	0.35	N.D.	0.34	0.35
	0.56	N.D.	0.56	0.50	0.56	N.D.	0.55	0.56
AS	0.19	N.D.	0.19	0.05	0.18	N.D.	0.19	N.D.
	-	-	-	0.18	-	-	-	-
	-	-	-	0.19	-	-	-	-
AL	0.20	N.D.	0.23	0.05	0.19	N.D.	0.19	0.19
	-	-	-	0.18	-	-	-	0.21*
	-	-	-	0.21	-	-	-	-

<u>หมายเหตุ</u> N.D. คือ ไม่ปรากฏสารกลุ่มนั้น

* คือ ฟอกจางมาก

การสกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายเอทานอล

(ระบบ TLC, 20% EtOAc:Hexane)

สารสกัด	ค่า R_f ของการทดสอบกลุ่มสาร							
	ฟลาโวนอยด์ (1%$AlCl_3$)		ฟีนอล/น้ำตาล/สเตอรอยด์/เทอร์พีน (P-anisalaldehyde)		ไนโตรเจน/แอลคาลอยด์ (Dragendroff)		การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH)	
	UV	spray	UV	spray	UV	spray	UV	spray
BR1	0.16	N.D.	0.15	0.16	0.15	N.D.	0.14	N.D.
	-	-	-	0.54	-	-	-	-
BRH1	0.15	N.D.	0.18	0.05	0.14	N.D.	0.15	N.D.
	-	-	-	0.10	-	-	-	-
	-	-	-	0.13	-	-	-	-
	-	-	-	0.18	-	-	-	-
	-	-	-	0.21	-	-	-	-
	-	-	-	0.25	-	-	-	-
	-	-	-	0.34	-	-	-	-
	-	-	-	0.38	-	-	-	-
	-	-	-	0.45	-	-	-	-
	-	-	-	0.56	-	-	-	-
	-	-	-	0.65	-	-	-	-
	-	-	-	0.75	-	-	-	-
BS1	0.14	N.D.	0.15	0.56	0.13	N.D.	0.14	N.D.
BL1	0.10	N.D.	0.13	0.55	0.10	N.D.	0.11	N.D.

หมายเหตุ N.D. คือ ไม่ปรากฏสารกลุ่มนั้น

การสกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

(ระบบ TLC, 20% EtOAc:Hexane)

สารสกัด	ค่า R_f ของการทดสอบกลุ่มสาร							
	ฟลาโวนอยด์ ($1\%AlCl_3$)		ฟีนอล/น้ำตาล/สเตอรอยด์/เทอร์พีน (P-anisalaldehyde)		ไนโตรเจน/แอลคาลอยด์ (Dragendroff)		การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH)	
	UV	spray	UV	spray	UV	spray	UV	spray
BR2	0.03	N.D	0.04	0.05	0.03	N.D	0.04	N.D
	0.05	N.D	0.06	0.08	0.06	N.D	0.06	N.D
	0.15	N.D	0.16	0.11	0.15	N.D	0.14	N.D
	0.53	N.D	0.55	0.15	0.53	N.D	0.50	N.D
	-	-	-	0.30	-	-	-	-
	-	-	-	0.43	-	-	-	-
	-	-	-	0.53	-	-	-	-
	-	-	-	0.73	-	-	-	-
	-	-	-	0.63	-	-	-	-
	-	-	-	0.70	-	-	-	-
	-	-	-	0.80	-	-	-	-
BRH2	0.10	N.D	0.11	0.05	0.10	N.D	0.10	N.D
	-	-	-	0.08	-	-	-	-
	-	-	-	0.10	-	-	-	-
	-	-	-	0.13	-	-	-	-
	-	-	-	0.15	-	-	-	-
	-	-	-	0.28	-	-	-	-
	-	-	-	0.43	-	-	-	-
BS2	0.04	N.D	0.05	0.05	0.04	N.D	0.04	N.D
	-	-	-	0.08	-	-	-	-
	-	-	-	0.26	-	-	-	-
	-	-	-	0.43	-	-	-	-

<u>หมายเหตุ</u> N.D. คือ ไม่ปรากฏสารกลุ่มนั้น

การสกัดแบบซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

(ระบบ TLC, 20% EtOAc:Hexane)

สารสกัด	ค่า R_f ของการทดสอบกลุ่มสาร							
	ฟลาโวนอยด์ ($1\%AlCl_3$)		ฟีนอล/น้ำตาล/สเตอรอยด์/เทอร์พีน (P-anisalaldehyde)		ไนโตรเจน/แอลคาลอยด์ (Dragendroff)		การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH)	
	UV	spray	UV	spray	UV	spray	UV	spray
BL2	0.04	N.D	0.04	0.06	0.04	N.D	0.04	N.D
	0.55	N.D	0.54	0.08	0.54	N.D	0.53	N.D
	-	-	-	0.28	-	-	-	-
	-	-	-	0.53	-	-	-	-

<u>หมายเหตุ</u> N.D. คือ ไม่ปรากฏสารกลุ่มนั้น

สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล

(ระบบ TLC, 2% MeOH:Hexane)

สารสกัด	ค่า R_f ของการทดสอบกลุ่มสาร							
	ฟลาโวนอยด์ ($1\%AlCl_3$)		ฟีนอล/น้ำตาล/สเตอรอยด์/เทอร์พีน (P-anisalaldehyde)		ไนโตรเจน/แอลคาลอยด์ (Dragendroff)		การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH)	
	UV	spray	UV	spray	UV	spray	UV	spray
CRH	0.05	N.D	0.05	0.05	0.04	1.00	0.04	0.23
	-	-	-	0.09	-	-	-	-
	-	-	-	0.38	-	-	-	-
	-	-	-	0.46	-	-	-	-
	-	-	-	0.65	-	-	-	-
CS	0.04	N.D	0.04	N.D	0.04	1.00	0.04	0.19

<u>หมายเหตุ</u> N.D. คือ ไม่ปรากฏสารกลุ่มนั้น

การสกัดด้วยวิธี Partition

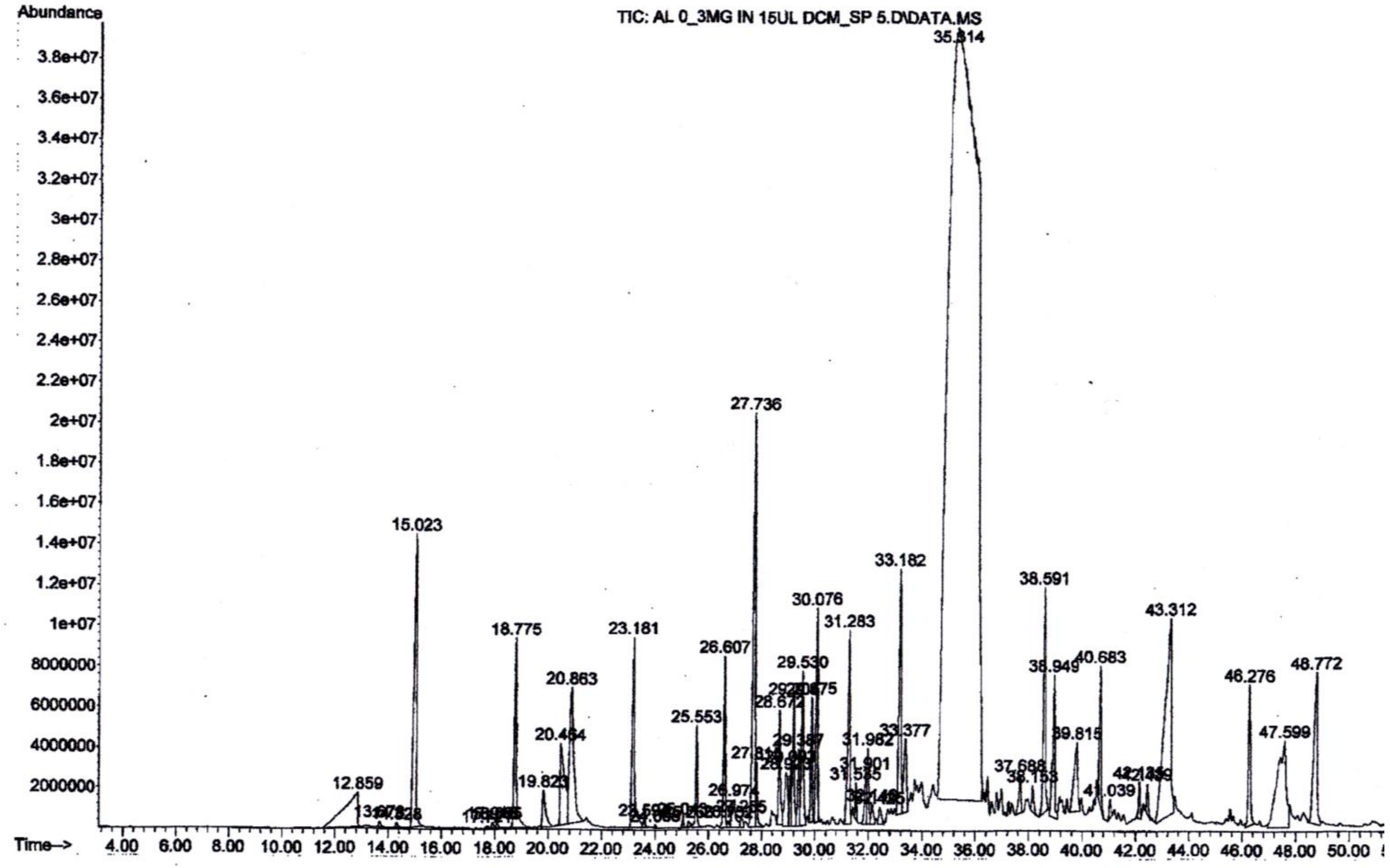
(ระบบ TLC, 30% EtOAc:Hexane)

สารสกัด	ค่า R_f ของการทดสอบกลุ่มสาร							
	ฟลาโวนอยด์ (1%$AlCl_3$)		ฟีนอล/น้ำตาล/สเตอรอยด์/เทอร์พีน (P-anisalaldehyde)		ไนโตรเจน/แอลคาลอยด์ (Dragendroff)		การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH)	
	UV	spray	UV	spray	UV	spray	UV	spray
CRH1 (Hexane)	-	N.D.	-	0.04	-	N.D.	-	0.001
	-	-	-	0.08	-	-	-	-
	-	-	-	0.15	-	-	-	-
	-	-	-	0.21	-	-	-	-
	-	-	-	0.28	-	-	-	-
	-	-	-	0.33	-	-	-	-
CRH2 (Ethyl acetate	0.38	N.D.	0.40	0.03	0.375	N.D.	0.38	0.001
	-	-	-	0.06	-	-	-	-
	-	-	-	0.14	-	-	-	-
	-	-	-	0.20	-	-	-	-
	-	-	-	0.23	-	-	-	-
	-	-	-	0.31	-	-	-	-
	-	-	-	0.40	-	-	-	-

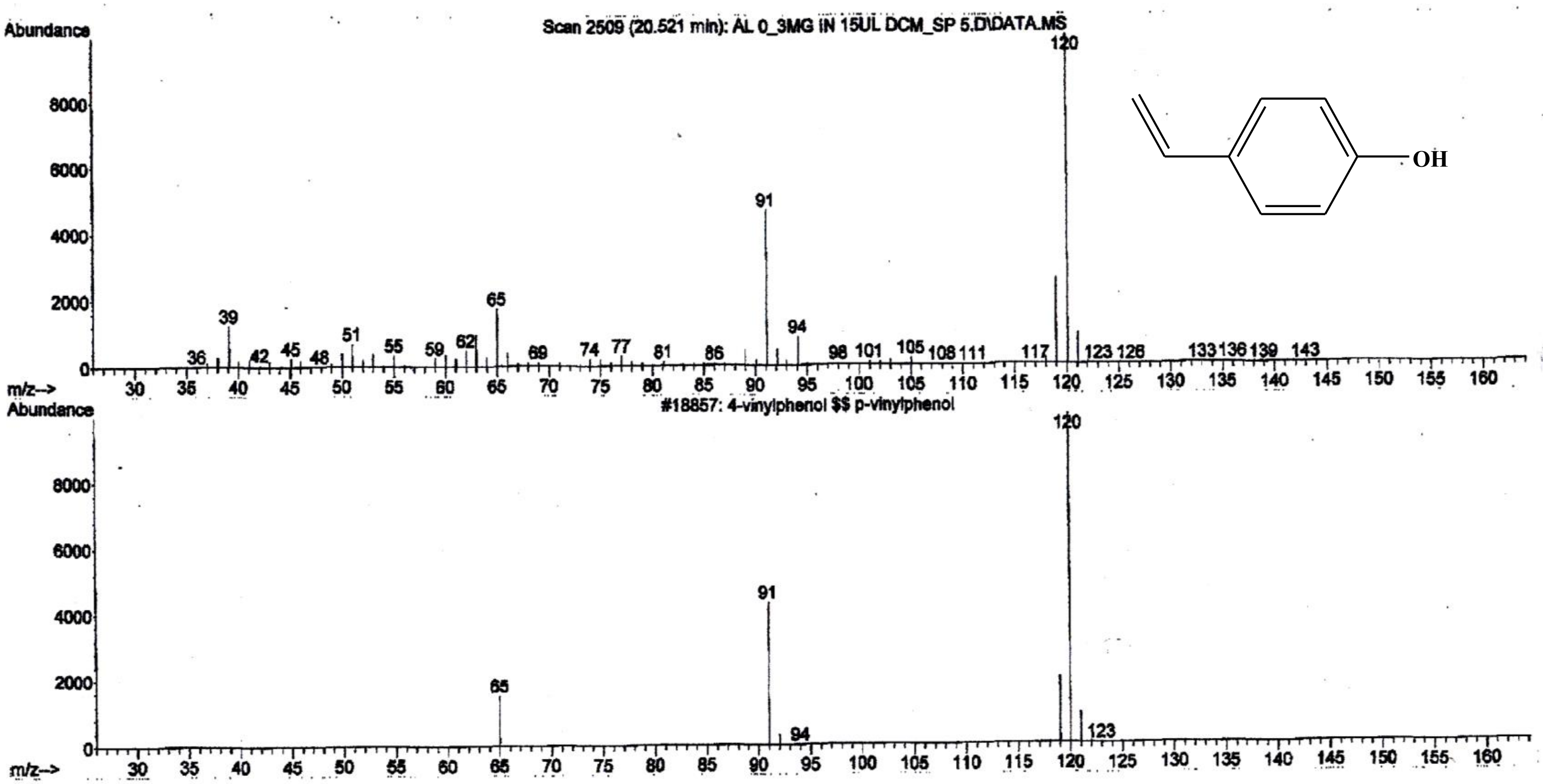
<u>หมายเหตุ</u> N.D. คือ ไม่ปรากฏสารกลุ่มนั้น

ภาคผนวก ฉ

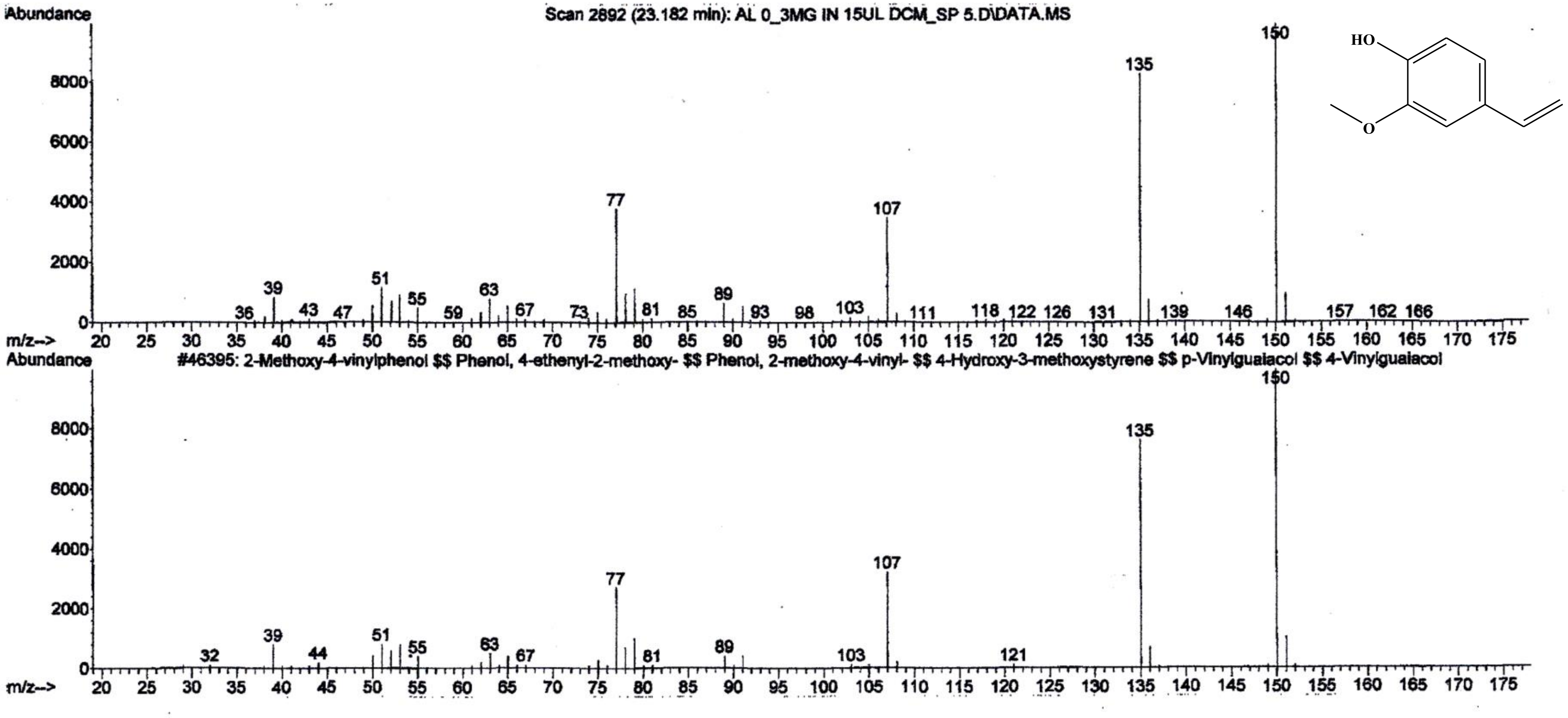
โครมาโทแกรม



ภาพที่ ฉ-1 โครมาโทแกรมของสารสกัดบอนหอมส่วนใบที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ (AL) จากการวิเคราะห์ด้วย GC/MS

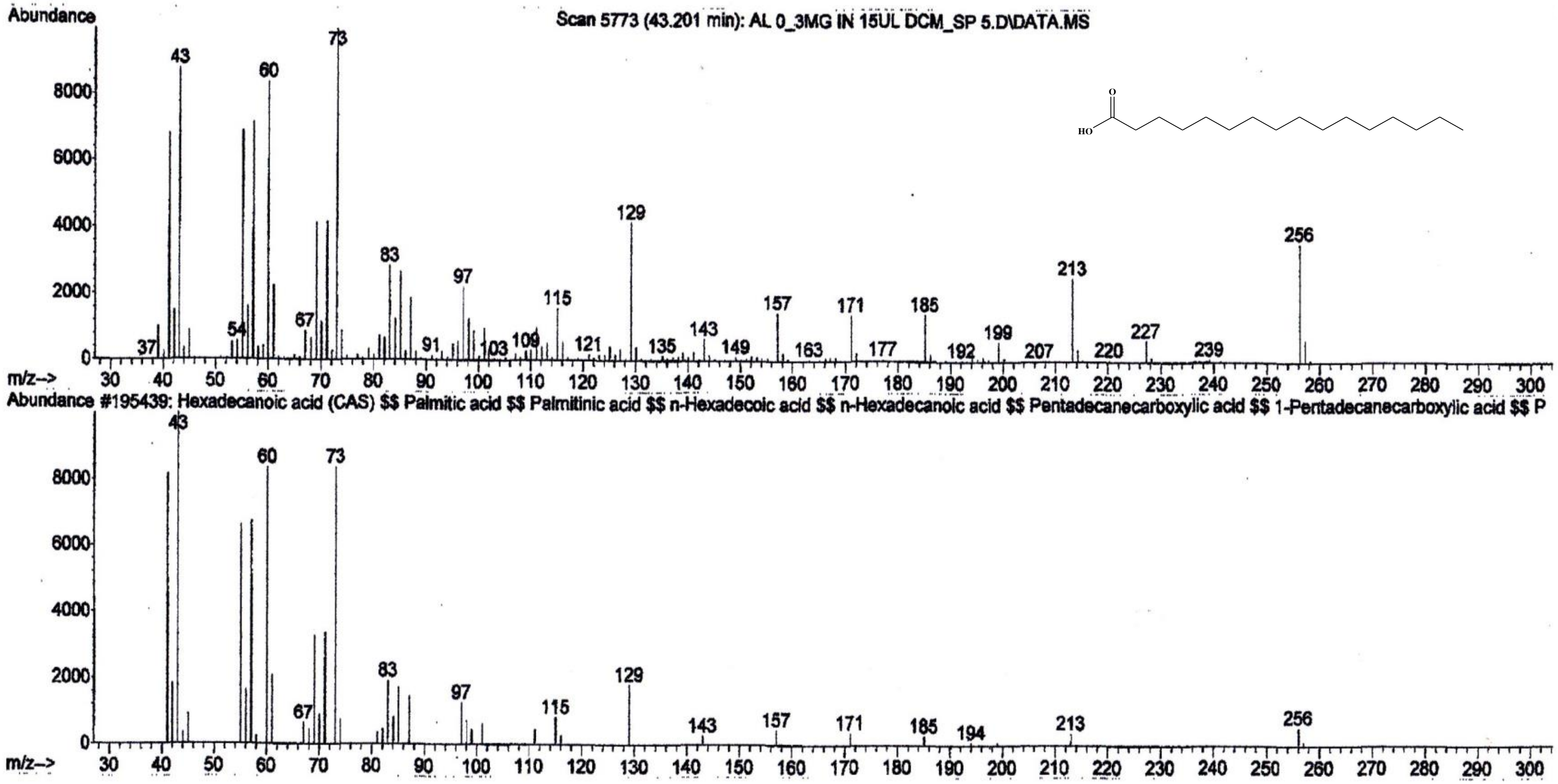


ภาพที่ ฉ-2 โครมาโทแกรมของสารสกัดบอนหอมส่วนใบที่กลั่นด้วยน้ำ (AL) ที่ได้จาก เครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched : Wiley7N edition, Retention Time 20.46 minute, Quality : 86 %, Total : 1.09 %, ID : 4-Vinylphenol



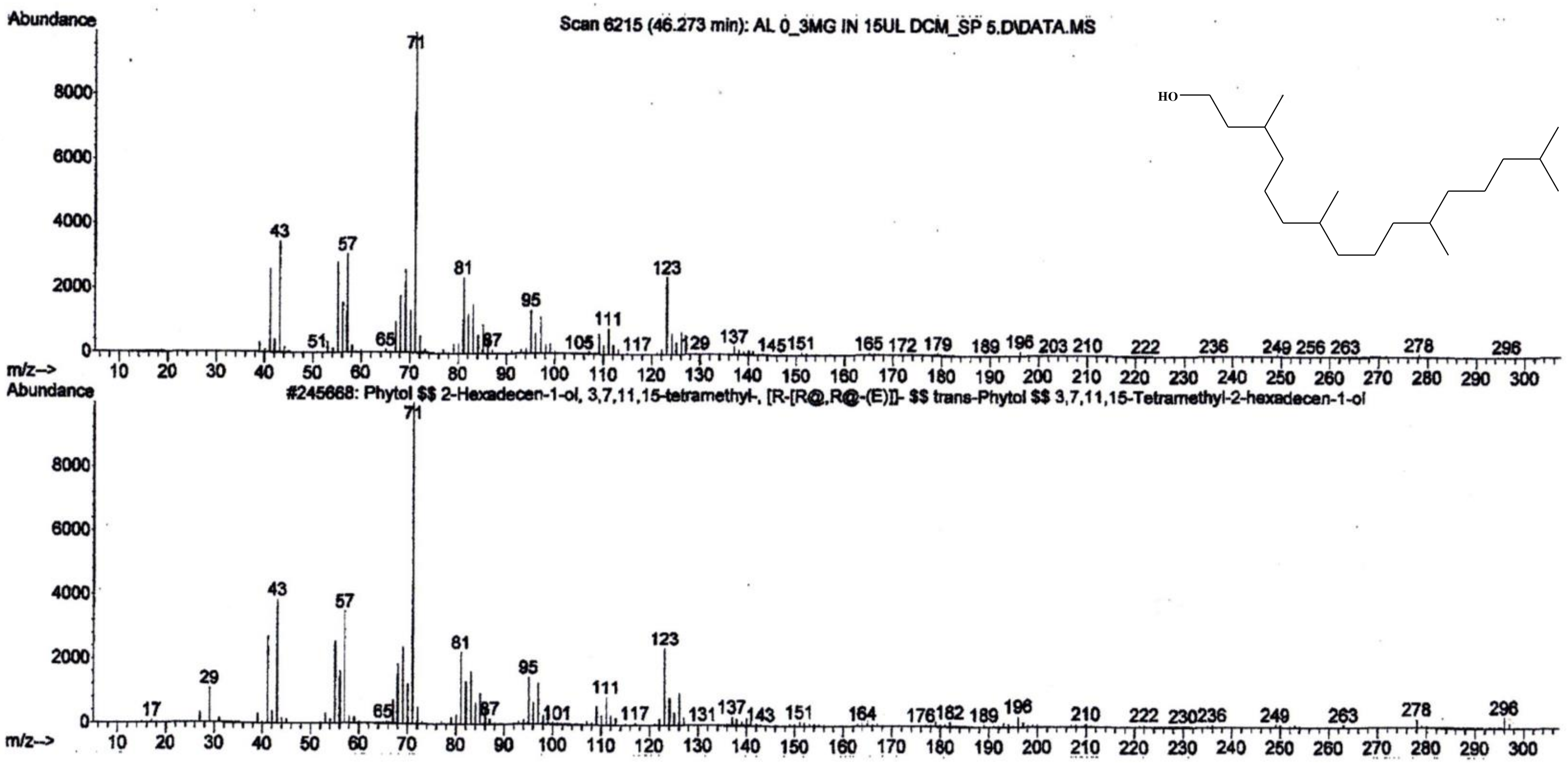
ภาพที่ ฉ-3 โครมาโทแกรมของสารสกัดบอนหอมส่วนใบที่กลั่นด้วยน้ำ (AL) ที่ได้จาก เครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched :

Wiley7N edition, Retention Time 23.18minute, Quality : 96 %, Total : 1.34 %, ID : 4-vinylguaiacol



ภาพที่ ฉ-4 โครมาโทแกรมของสารสกัดบอนหอมส่วนใบที่กลั่นด้วยน้ำ (AL) ที่ได้จาก เครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched :

Wiley7N edition, Retention Time 43.31minute, Quality : 99 %, Total : 3.79 %, ID : Palmitic acid



ภาพที่ ฉ-5 โครมาโทแกรมของสารสกัดบอนหอมส่วนใบที่กลั่นด้วยน้ำ (AL) ที่ได้จาก เครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched : Wiley7N edition, Retention Time 46.27minute, Quality : 96 %, Total : 0.84 %, ID : Phytol

ภาคผนวก ช

การหาค่า IC_{50} ในการกำจัดอนุมูล DPPH

1. การหาค่า IC_{50} ของ Ascorbic acid

จากสมการ $y = 32.15X - 54.109$

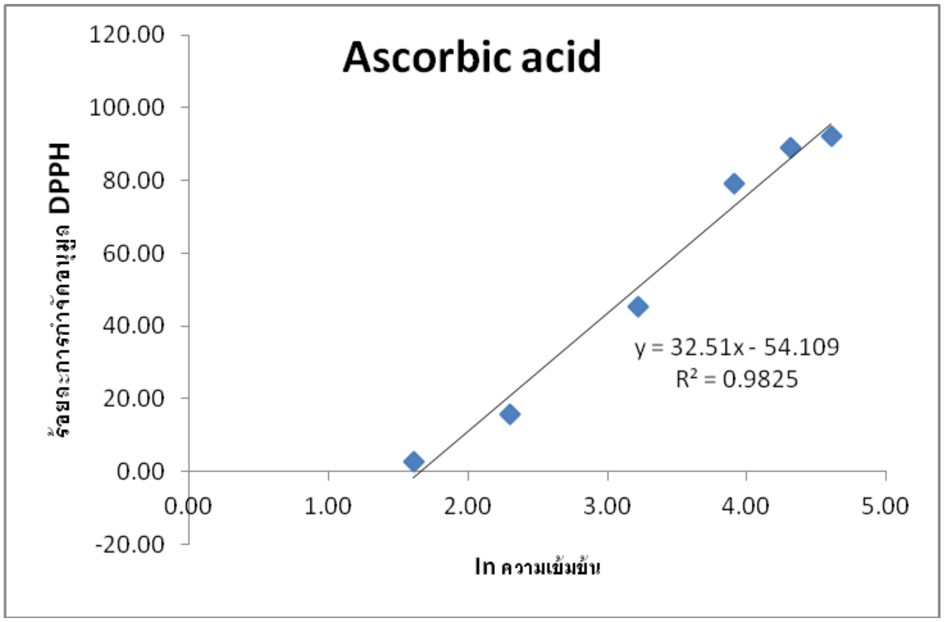
แทนค่า $y = 50$

$$50 = 32.15X - 54.109$$

$$X = 3.202340127$$

ความเข้มข้นสาร e^x

ดังนั้นความเข้มข้นสาร = 24.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ ช-1 กราฟสมการในการคำนวณ IC_{50} ของสารมาตรฐาน Ascorbic acid

2. การหาค่า IC_{50} ของ Gallic acid

จากสมการ $y = 19.704X - 6.5439$

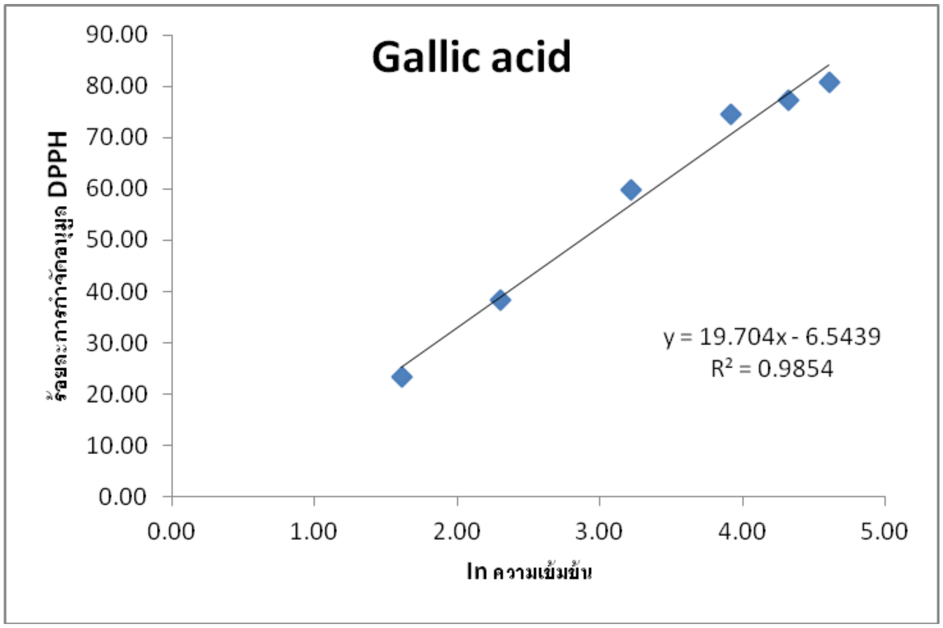
แทนค่า $y = 50$

$$50 = 19.704X - 6.5439$$

$$X = 2.869731759$$

ความเข้มข้นสาร e^x

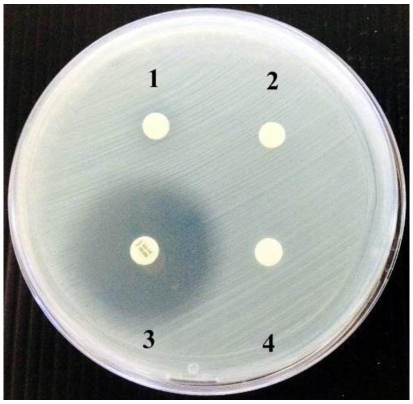
ดังนั้นความเข้มข้นสาร = 17.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ ช-2 กราฟสมการในการคำนวณ IC_{50} ของสารมาตรฐาน Gallic acid

ภาคผนวก ซ
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดบอนหอม



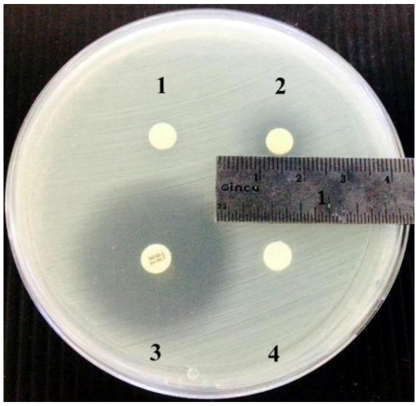
ภาพที่ ซ-1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร AR, ARH ในการต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

1 : AR (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : ARH (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



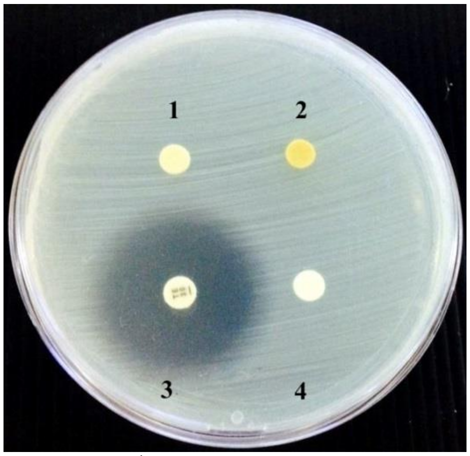
ภาพที่ ซ-2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร AS, AL ในการต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

1 : AS (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : AL (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



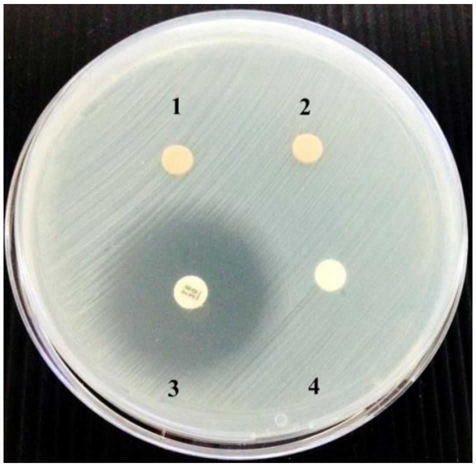
ภาพที่ ซ-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BR1, BRH1 ในการต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

1 : BR1 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : BRH1 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



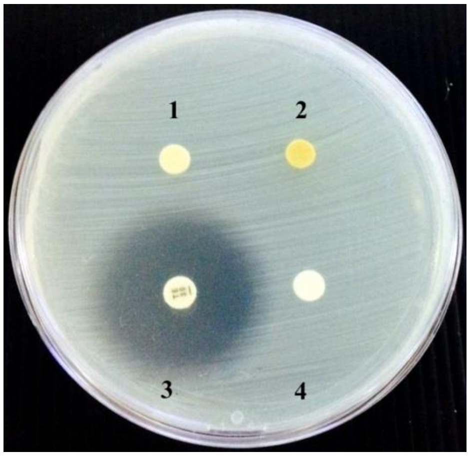
ภาพที่ ซ-4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BS1, BL1 ในการต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

1 : BS1 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : BL1 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



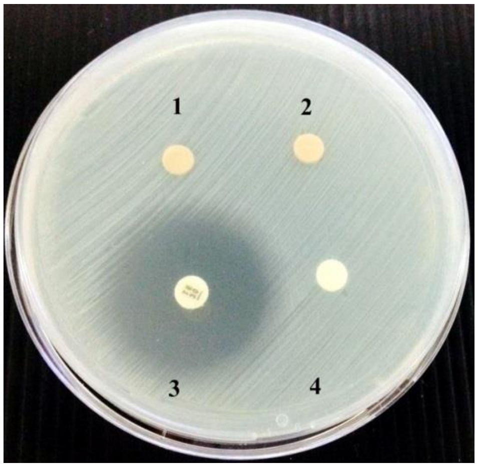
ภาพที่ ซ-5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BR2, BRH2 ในการต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

1 : BR2 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : BRH2 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



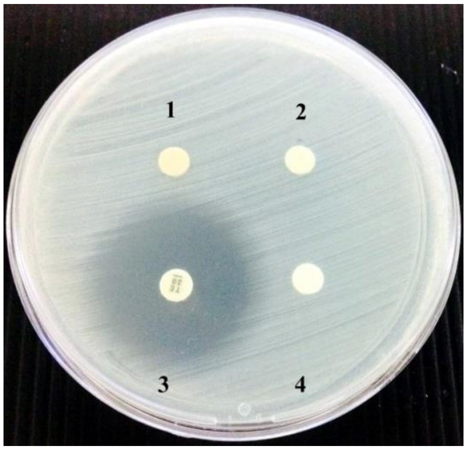
ภาพที่ ซ-6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BS2, BL2 ในการต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

1 : BS2 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : BL2 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



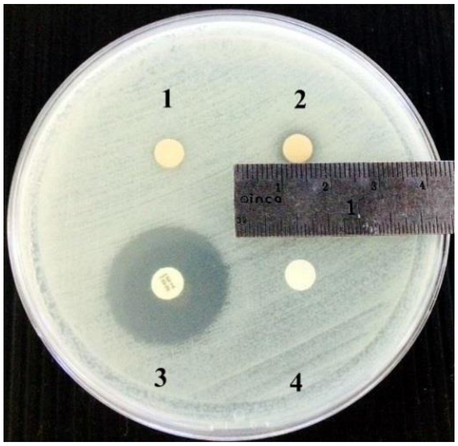
ภาพที่ ซ-7 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร CRH, CS ในการต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

1 : CRH (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : CS (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



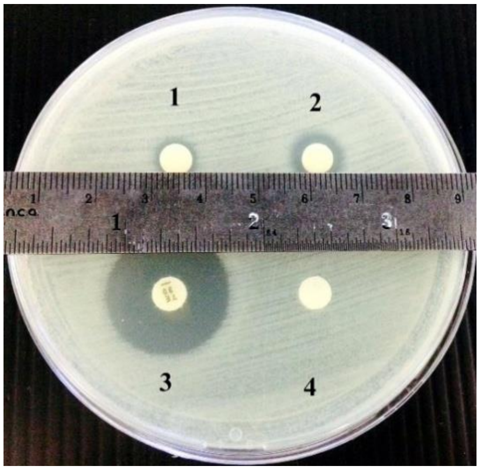
ภาพที่ ซ-8 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร AR, ARH ในการต้านการเจริญของ *Bacillus cereus* ATCC 11778

1 : AR (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : ARH (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



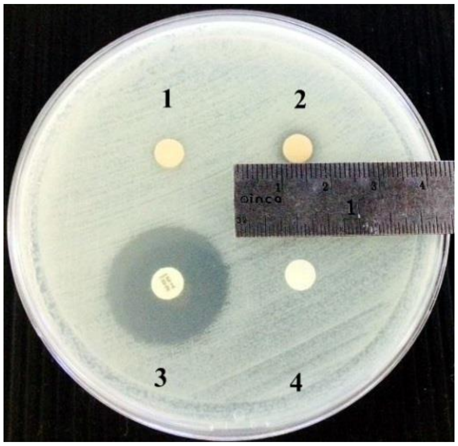
ภาพที่ ซ-9 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร AS, AL ในการต้านการเจริญของ *Bacillus cereus* ATCC 11778

1 : AS (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : AL (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



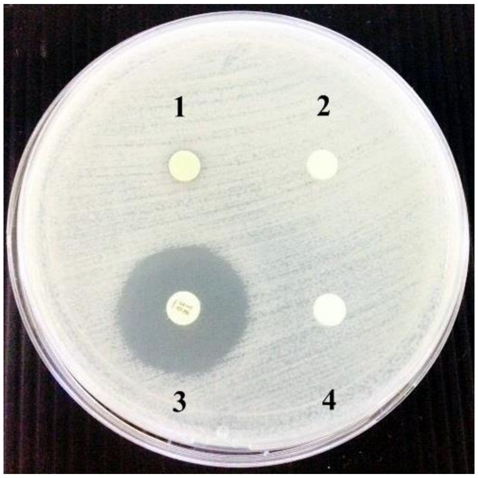
ภาพที่ ซ-10 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BR1, BRH1ในการต้านการเจริญของ *Bacillus cereus* ATCC 11778

1 : BR1 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : BRH1 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



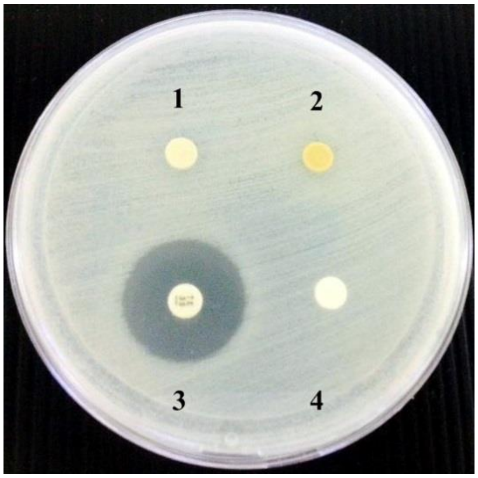
ภาพที่ ซ-11 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BS1,BL1 ในการต้านการเจริญของ *Bacillus cereus* ATCC 11778

1 : BS1 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : BL1 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



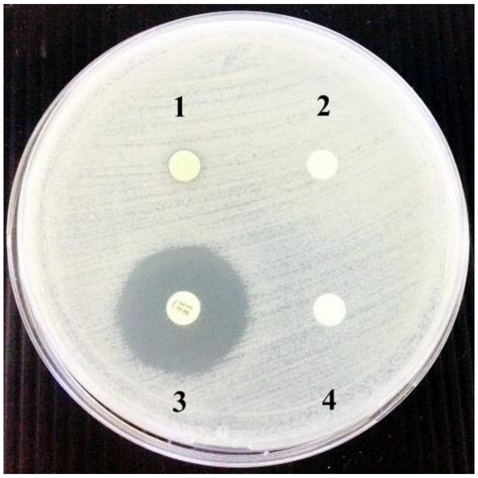
ภาพที่ ซ-12 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BR2, BRH2 ในการต้านการเจริญของ *Bacillus cereus* ATCC 11778

1 : BR2 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : BRH2 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



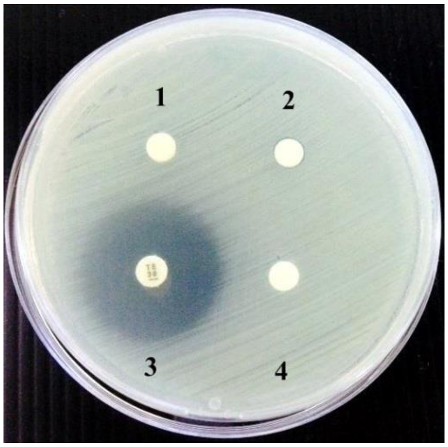
ภาพที่ ซ-13 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BS2, BL2 ในการต้านการเจริญของ *Bacillus cereus* ATCC 11778

1 : BS2 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : BL2 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



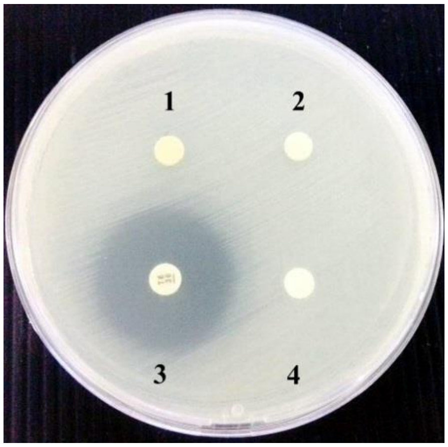
ภาพที่ ซ-14 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร CRH, CS ในการต้านการเจริญของ *Bacillus cereus* ATCC 11778

1 : CRH (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : CS (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



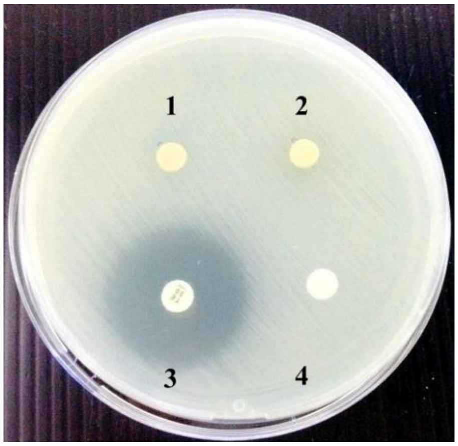
ภาพที่ ซ-15 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร AR, ARH ในการต้านการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922

1 : AR (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : ARH (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



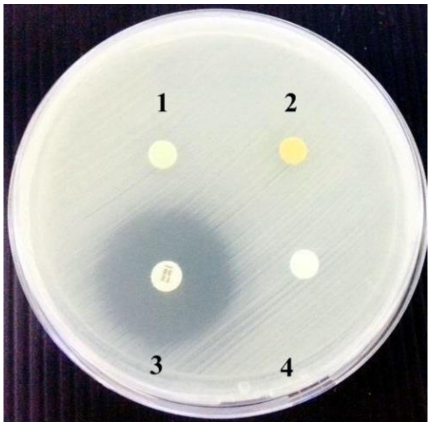
ภาพที่ ซ-16 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร AS, AL ในการต้านการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922

1 : AS (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : AL (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



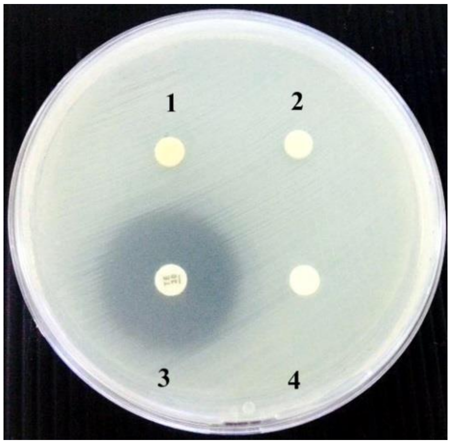
ภาพที่ ซ-17 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BR1, BRH1ในการต้านการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922

1 : BR1 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : BRH1 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



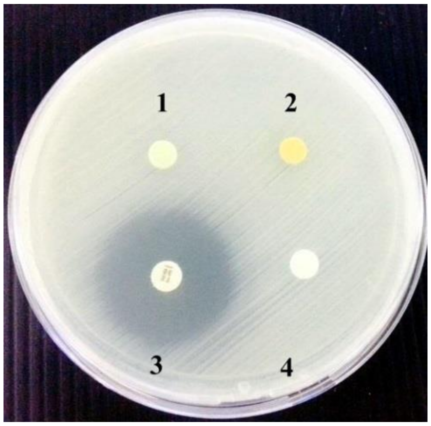
ภาพที่ ซ-18 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BS1, BL1 ในการต้านการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922

1 : BS1 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : BL1 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



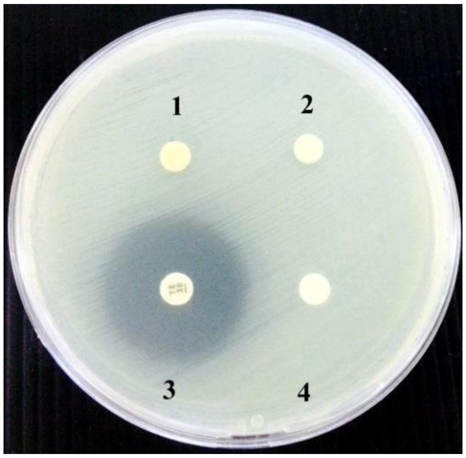
ภาพที่ ซ-19 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BR2, BRH2 ในการต้านการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922

1 : BR2 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : BRH2 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



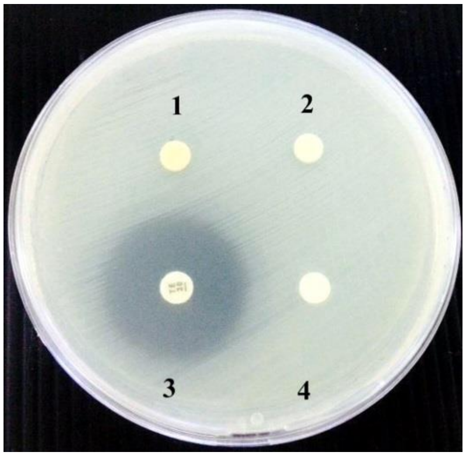
ภาพที่ ซ-20 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร BS2, BL2 ในการต้านการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922

1 : BS2 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : BL2 (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



ภาพที่ ซ-21 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ของสาร CRH, CS ในการต้านการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922

1 : CRH (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : CS (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : ดิสก์ยา tetracycline 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

4 : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)

ภาคผนวก ญ

การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 mM ในเอทานอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

จากสมการ

P = (MW x M xV) / 1000

P = เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของ DPPH

M = ความเข้มข้นของสารที่ต้องการเตรียม

V = ปริมาตรที่ต้องการเตรียม

MV = มวลโมเลกุลของ DPPH

แทนค่าลงในสมการ

P = (394.33 x 0.2 x 50) / 1000

= 3.94 mg

ดังนั้นต้องชั่งสาร DPPH มา 3.94 mg และปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้ได้ปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารทดสอบกลุ่มสารพฤกษเคมี

2.1 เตรียมสารละลาย 1% อลูมิเนียมคลอไรด์ในเอทานอล เพื่อทดสอบฟลาโวนอยด์

สเปรย์รีเอเจนท์: สารละลาย 1% aluminium chloride ใน ethanol

2.2 เตรียมสารละลาย *p*-anisaldehyde-sulfuric acid เพื่อทดสอบ ฟีนอล น้ำตาล สเตอรอยด์ และเทอร์พีน

สเปรย์รีเอเจนท์: สารละลายที่เตรียมใหม่ ๆ ของ *p*-anisaldehyde 0.5 มิลลิลิตร ใน glacial acetic acid 50 มิลลิลิตร และ 97% sulfuric acid 1 มิลลิลิตร

2.3 เตรียมสารละลายดราเจนดอร์ฟ (Dragendoff) เพื่อทดสอบสารประกอบไนโตรเจนอัลคาลอยด์ โดยเตรียมสารละลาย 2 ชนิด

สารละลายที่ 1: basic bismuth nitrate 1.7 กรัม และ tartaric acid 20 กรัม ในน้ำ 80 มิลลิลิตร

สารละลายที่ 2: potassium iodide 16 กรัมในน้ำ 40 มิลลิลิตร

เก็บสารลละลายในตู้เย็น สารละลายจะเสถียรเป็นเวลาหลายสัปดาห์เมื่อจะใช้สารละลาย น้ำสารละลายทั้งสองมาผสมกันด้วยปริมาตรเท่า ๆ กัน

สเปรย์รีเอเจนท์: สารละลาย tartaric 10 กรัม และน้ำ 50 มิลลิลิตร และ ของผสมสารละลายทั้งสองชนิด 5 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเอทานอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐาน Gallic acid 0.05 กรัม ละลายใน Absolute Ethanol 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ ในภาชนะห่อฟรอยด์ เก็บไว้ในตู้เย็น

4. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐาน Ascorbic acid 0.05 กรัม ละลายใน Absolute Ethanol 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ในภาชนะห่อฟรอยด์ เก็บไว้ในตู้เย็น

5. ตัวอย่างการเตรียมความเข้มข้นสารสกัดบอนหอมส่วนใบที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ (AL) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (Stock Solution)

การคำนวณ

สารสกัดบอนหอม	1000	มิลลิลิตร	มีน้ำหนัก	100	มิลลิกรัม
ถ้าสารสกัดบอนหอม	50	มิลลิลิตร	มีน้ำหนักเท่ากับ	$\frac{100 \times 50}{1000}$	มิลลิกรัม
เพราะฉะนั้นจะมีน้ำหนัก			เท่ากับ	5	มิลลิกรัม

ดังนั้นต้องชั่งสารสกัดบอนหอมส่วนใบมา 5 มิลลิกรัม แล้วละลายด้วยเอทานอลให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

6. ตัวอย่างการเตรียมความเข้มข้นสารละลายบอนหอม เพื่อนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย (Stock Solution)

เตรียมสารละลายบอนหอม ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ละลายสกัดบอนหอม 0.125 กรัม ปรับปริมาตรสารละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร (Stock Solution)

ต้องการใช้สารละลายบอนหอมปริมาตร 20 µL (ต่อดิสก์) จากสารละลายบอนหอมความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมมิลลิลิตร

สารลาย 1 มิลลิลิตร → มีเนื้อสารบอนหอม 25 มิลลิกรัม

สารละลาย 20 ไมโครลิตร → มีเนื้อสารบอนหอม = $\frac{25 \times 20 \times 10^{-6}}{1}$

เพราะฉะนั้นใน 1 ดิสก์ใช้สารสกัดบอนหอม = 0.5 มิลลิกรัม/ดิสก์