การสกัดสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากเพกา

จันทร์เพ็ญ โคตรภูธร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ตุลาคม 2559
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ จันทร์เพ็ญ โคตรภูธร ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงกลณี จงอร่ามเรือง)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน
(ดร.เนาวรัตน์ กองคำ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงกลณี จงอร่ามเรือง)

.....กรรมการ
(ดร.ศิริรัตน์ ชาญไววิทย์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทรวรรณ แสงแข)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษาของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)
วันที่ 4 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2559

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตร์ตราจารย์ ดร.จงกลณี จงอร่ามเรือง อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ช่วยเหลือในทุกปัญหาการวิจัยพร้อมทั้งให้กำลังใจ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ทุกท่าน ที่ช่วยสอนวิชาเคมีในส่วนของเนื้อหา และปฏิบัติการเคมีอย่างเข้มข้น เพื่อปลูกฝังให้ข้าพเจ้าเป็นนักวิทยาศาสตร์ และเป็นครูวิทยาศาสตร์ที่มีความรู้ในภาคทฤษฎี และภาคปฏิบัติวิชาเคมีเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) ที่ให้ทุนการศึกษาตลอดมา

ขอขอบพระคุณ นางสาวปาลิตา เอี่ยมหมดจด นิสิตปริญญาตรี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ช่วยให้ความรู้ แนะแนวทาง อำนวยความสะดวกในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย

ขอขอบพระคุณ สวนสุริยันต์ ตำบลบ้านแป้น อำเภอโพนนาแก้ว จังหวัดสกลนคร ที่ช่วยให้ความรู้ แนะแนวทาง อำนวยความสะดวกให้ความอนุเคราะห์เกี่ยวกับพืชตัวอย่างเพกา

ขอขอบพระคุณ นางสาววาทินี เสล่ราษฎร์ นางสาวพอตา ชัยกิจ และนางสาวเฉลิมขวัญ จันดี นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ช่วยให้ความรู้ แนะนำแนวทาง อำนวยความสะดวกในการทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น

ขอบกราบขอบพระคุณ คุณยายลาน คุณแม่กานต์สินี สาสนทาญาติ และสมาชิกในครอบครัวทุนคนที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนข้าพเจ้าเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

จันทร์เพ็ญ โคตรภูธร

57920925: สาขาวิชา: เคมีศึกษา; วท.ม. (เคมีศึกษา)
คำสำคัญ: เพกา/ สารพฤกษเคมี/ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ/ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

จันทร์เพ็ญ โคตรภูธร: การสกัดสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากเพกา (EXTRACTION, PHYTOCHEMICAL SCREENING, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL OF CRUDE EXTRACT FROM *OROXYLUM INDICUM*). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จงกลณี จงอร่ามเรือง, Ph.D. 65 หน้า.
ปี พ.ศ. 2559.

งานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเอทิลอะซิเตดและเมทานอลจากส่วนดอกแห้งและใบแห้งของเพกา โดยพบสารพฤกษเคมี ได้แก่ ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอยด์ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ฟลาโวนอยด์ สเตอรอยด์ คูมารินและอัลคาลอยด์ สารสกัดเมทานอลส่วนใบพบสารพฤกษเคมีมากที่สุด นำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทดสอบ DPPH พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตดส่วนใบแยกสารได้มากที่สุด 9 กลุ่มและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด และจากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar Disc Diffusion ของสารสกัดหยาบทั้ง 4 ชนิด พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตดส่วนดอกเพกามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ดีกว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตดและเมทานอลส่วนใบและเมทานอลส่วนดอก สารสกัดเอทิลอะซิเตดส่วนดอกเพกาแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้มากที่สุดมีค่าบริเวณการยับยั้ง 13.83 ± 2.88 และ 11.00 ± 0.50 ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดดอกเพกาเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านแบคทีเรียจากธรรมชาติ และอาจนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ทางยาได้

57920925: MAJOR: CHEMICAL EDUCATION; M.S (CHEMICAL EDUCATION)
KEYWORDS: *OROXYLUM INDICUM*/ PHYTOCHEMICAL/ ANTIOXIDANT/
ANTIBACTERIAL
JANPEN KOTPOOHTORN: EXTRACTION, PHYTOCHEMICAL SCREENING, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL OF CRUDE EXTRACT FROM *OROXYLUM INDICUM*. ADVISORY COMMITTEE: JONGKOLNEE JONGARAMRUONG, Ph.D.
65 P. 2016.

In this research, phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of the ethyl acetate and methanol extracts from the dried flowers and leaves of *Oroxylum indicum* revealed the presence of bioactive substances such as saponins, tannins, terpenoids, cardiac glycosides, flavonoids, steroids, coumarin and alkaloids. The antioxidant activity was obtained using TLC screening with DPPH method. The results showed that ethyl acetate extract of leaves showed more separate 9 groups and the highest antioxidant activities. Antibacterial activities by the agar disc diffusion method of crude extracts were tested. It was found that, ethyl acetate extracts from flowers showed more potential inhibitor of *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* than ethyl acetate and methanol extracts from leaves and methanol extracts from flowers. The flowers extraction of *O. indicum* showed the highest antibacterial activities against *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* with the inhibition zone of 13.83 ± 2.88 and 11.00 ± 0.50 respectively. Therefore, the flavors of *O. indicum* extract could be a good source of natural antioxidant and antibacterial agent which could be applied in food, cosmetic and pharmaceutical products.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

ขอบเขตของการวิจัย 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 3

นิยามศัพท์เฉพาะ 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

ข้อมูลพฤกษศาสตร์ของเพกา (Oroxylum indicum) 4

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร 6

พฤกษเคมีเบื้องต้น 9

อนุมูลอิสระ (Free radical) 14

เชื้อแบคทีเรียและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดจากสมุนไพร 15

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 21

3 วิธีดำเนินการวิจัย 28

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี 28

พืชตัวอย่าง 29

วิธีการวิจัย 30

วิธีดำเนินการวิจัย 31

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี 28

พืชตัวอย่าง 29

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	35
การสกัดสารสกัดเพกา	35
การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)	36
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	38
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย	39
5 สรุปผลการทดลอง	42
ข้อเสนอแนะ	43
บรรณานุกรม	44
ภาคผนวก	48
ภาคผนวก ก	49
ภาคผนวก ข	52
ภาคผนวก ค	54
ภาคผนวก ง	60
ประวัติย่อของผู้วิจัย	65

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2-1 โครงสร้างของสารทั้งหมดยืนยันด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี 23

2-2 ผลการยับยั้งเอนไซม์ lipoxygenase 23

2-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของส่วนสกัดหยาบ (100 μg) และ สารประกอบที่แยกได้ (5 μg) จากรากและเปลือกต้นเพกา 24

4-1 ลักษณะทางกายภาพและปริมาณที่สกัดได้ (Yield) ของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตดและเมทานอลของเพกา 36

4-2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตดและเมทานอล จากส่วนดอกและใบของเพกา 37

4-3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนดอกและใบเพกาที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตดและเมทานอล 38

4-4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเพกา 41

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ส่วนต่าง ๆ ของเพกา (ก) ดอกเพกา (ข) เมล็ดเพกา	5
2-2	ส่วนต่าง ๆ ของเพกา (ก) ฝักอ่อน (ข) เปลือกต้นเพกา (ค) ใบเพกา (ง) ฝักแก่	6
2-3	สูตรโครงสร้างของ Caffeine	10
2-4	สูตรโครงสร้างของ Genistein	10
2-5	สูตรโครงสร้างของ Chrysophanol	11
2-6	สูตรโครงสร้างของ Umbelliferone	11
2-7	สูตรโครงสร้างของ Glycyrrhtzin	12
2-8	สูตรโครงสร้างของ Gallotannin	12
2-9	สูตรโครงสร้างของ Squalene	13
2-10	สูตรโครงสร้างของ Testosterone	13
2-11	สูตรโครงสร้างของ Oleandrin	14
2-12	แสดงปฏิกิริยาการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH	15
2-13	ผลการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC ของสารประกอบต่าง ๆ หลังจากแยกให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิค HSCCC	25
2-14	โครงสร้างของสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่แยกได้	26
2-15	โครงสร้างสารใหม่ Chrysin 6-C-β-D-glucopyranosyl-8-O-β-D-glucuronopyranoside	27
3-1	แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย	30
3-2	ส่วนดอกและใบของเพกา (ก) ดอกเพกาแห้ง (ข) ดอกเพกาแห้งบดละเอียด (ค) ใบเพกาแห้ง (ง) ใบเพกาแห้งบดละเอียด	31
4-1	แผ่นโครมาโทกราฟแบบบาง (TLC) ที่ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ก) ยังไม่ฉีดพ่นด้วยสารละลาย DPPH (ข) ฉีดพ่นด้วยสารละลาย DPPH	39
4-2	ภาพแสดงตัวอย่างการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย S. aureus ของสารสกัดหยาบเพกา ชั้นเอทิลอะซิเตดส่วนดอก (FE) และใบ (LE) ชั้นเมทานอลส่วนดอก (FM) และใบ (LM)	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
ก-1	การสกัดเพกาส่วนดอกแห้งที่บดละเอียดด้วยทำละลายเมทานอล	50
ก-2	การสกัดเพกาส่วนดอกแห้งที่บดละเอียดด้วยทำละลายเอทิลอะซิเตด	50
ก-3	กรองสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	51
ก-4	การระเหยด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (Rotary evaporator)	51
ข-1	การทดสอบ TLC หาระบบแยกสารสกัดเพกาด้วยวิธีการแช่ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตดและเมทานอลและการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี TLC	53
ค-1	การตรวจสอบอัลคาลอยด์ (Alkaloids)	55
ค-2	การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)	55
ค-3	การตรวจสอบแอนทราควิโนน (Anthaquinones)	56
ค-4	การตรวจสอบคูมาริน (Coumarin)	56
ค-5	การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins)	57
ค-6	การตรวจสอบแทนนิน (Tannins)	57
ค-7	การตรวจสอบโฟลบาแทนนิน (Phlobatannins)	58
ค-8	การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids)	58
ค-9	การตรวจสอบสเตอรอยด์ (Steroids)	59
ค-10	การตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides)	59
ง-1	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion ของสาร FE LE FM และ LM ในการต้านการเจริญของ Bacillus subtilis	61
ง-2	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion ของสาร FE LE FM และ LM ในการต้านการเจริญของ Staphylococcus aureus	62
ง-3	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion ของสาร FE LE FM และ LM ในการต้านการเจริญของ Pseudomonas aeruginosa	63
ง-4	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion ของสาร FE LE FM และ LM ในการต้านการเจริญของ Escherichia coli	64

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยพืชผักนานาชนิด และมีความแตกต่างกันไปในแต่ละเขตพื้นที่ ตามลักษณะภูมิอากาศ ลักษณะภูมิประเทศ และสิ่งที่น่าสนใจ คือ พืชผักพื้นบ้าน ในแต่ละท้องถิ่นที่มี คุณสมบัติ เป็นเอกลักษณ์ของตนเอง ถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในการประกอบอาหาร เป็นเครื่องเทศเพื่อปรุงแต่ง สี กลิ่นรส และเป็นส่วนประกอบในยาสมุนไพรพื้นบ้าน ดังนั้น แนวทางในการเลือกรับประทานผัก จึงเป็นสิ่งที่ทั่วโลกให้ความสนใจและตระหนักถึงความสำคัญโดยเฉพาะพืชผักสมุนไพรพื้นบ้าน เป็นแนวทางหนึ่งที่ ผู้บริโภคนิยมเลือกนำมาบริโภคเป็นอาหารนำมาใช้ดูแล บำรุงรักษาป้องกันสุขภาพร่างกาย ทั้งนี้ เนื่องจากสภาวะสิ่งแวดล้อมในสังคมปัจจุบันที่ พบว่ามีปัญหาด้านมลพิษต่าง ๆ อยู่รอบ ๆ ตัวเรา อันเป็นสาเหตุของการเกิดโรคภัยไข้เจ็บ ร่างกายไม่สร้างภูมิคุ้มกัน ซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุ สำคัญที่ทำให้เกิดโรคภัยต่าง ๆ การเสื่อมสภาพของเซลล์ จึงมีการทดลองวิจัยทางวิทยาศาสตร์ และได้พิสูจน์ว่า สารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งพบได้ในอาหาร พืช ผักและผลไม้มีบทบาทสำคัญในการลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคต่าง ๆ เรียกได้ ว่าเป็นสารที่ สามารถลด ชะลอ หรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา ไม่ทำลายสารชีวโมเลกุลในร่างกาย (โอภา วัชระคุปต์, 2549) จากปัญหาเรื่องโรคภัยไข้เจ็บนี้ ทำให้มนุษย์มีความใส่ใจดูแลสุขภาพร่างกายมากยิ่งขึ้น

พืชสมุนไพรเป็นผลผลิตจากธรรมชาติที่มนุษย์รู้จักนำมาใช้เป็นประโยชน์และมีบทบาทในการดูแลด้านสุขภาพของผู้บริโภคทั้งในด้านการป้องกันโรคและการรักษาโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่ไม่สามารถรักษาด้วยยาแผนปัจจุบัน ซึ่งปัจจุบันในอาหารและสิ่งแวดล้อมมีสารอนุมูลอิสระและเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคอาหารเป็นพิษ ถึงแม้ว่าจะมีทั้งสารเคมีและยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและรักษาโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ แต่สารดังกล่าวเป็นสารสังเคราะห์จึงอาจมีผลข้างเคียง มีโอกาสเป็นพิษและมีราคาค่อนข้างสูง ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้มีผู้สนใจหันมาใช้สมุนไพรแทนในการดูแลรักษาสุขภาพ

เพกา (*Oroxylum indicum*) เป็นพืชอาหารในตำรายาแผนโบราณของจีน ระบุสรรพคุณผล (ฝัก) ของเพกาว่าเป็น antiinflammatory, antipyretic และ antihypersensitivity มี รายงานวิจัยแสดงฤทธิ์ ของสารสกัดจากเปลือกรากเพกาว่ามีฤทธิ์ antiulcer (Khandhar et al., 2006) และฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Nakahara et al., 2001; Roy et al., 2007) และเพกาจัดเป็นพืชสมุนไพร

ตามตำราแพทย์แผนไทยทุกส่วนมีสรรพคุณใช้รักษาและป้องกันการเกิดโรคได้ เช่น เปลือกต้นมีรสฝาดเย็นขมเล็กน้อย ตำกับสุรา ทา พ่นตามตัวสตรีที่ทนการอยู่ไฟไม่ได้ ทำให้หนังชา สมานแผล ทำให้น้ำเหลืองปกติ ดับพิษโลหิต ฝักแก่มีรสขม แก้ร้อนในกระหายน้ำ ฝักอ่อน รสขมร้อนช่วยขับผายลม เมล็ดแก่รสขม ช่วยระบายท้อง รากช่วยบำรุงธาตุ ทำให้เกิดน้ำย่อยอาหาร แก้ท้องร่วง ฝนกับน้ำปูนใส ทาแก้บวมอักเสบ (อุดมการณ์ อินทุใส และปาริชาติ ทะนานแก้ว, 2549)

ด้วยเพกาเป็นพืชพื้นบ้านที่สามารถนำมารับประทานในชีวิตประจำวันและใช้ประโยชน์ด้านยารักษาโรคตามภูมิปัญญาชาวบ้าน ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย จากดอกและใบของเพกา ที่พบในเขตพื้นที่ตำบลบ้านแป้น อำเภอโพนนาแก้ว จังหวัดสกลนคร โดยใช้วิธีการแช่ด้วยตัวทำละลาย พร้อมทั้งทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เพื่อเป็นข้อมูลที่สนับสนุนการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ของส่วนสกัดหยาบจากส่วนดอกและใบของเพกาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตดและเมทานอล
2. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของส่วนสกัดหยาบจากส่วนดอกและใบของเพกา

ขอบเขตของการวิจัย

1. เตรียมส่วนสกัดหยาบจากดอกและใบของต้นเพกา โดยใช้วิธีการสกัดแบบแช่หมัก (Maceration) ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตดและเมทานอล
2. ทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตดและเมทานอลจากดอกและใบเพกา แบ่งการทดสอบเป็น 10 กลุ่มคือ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน โฟลบาแทนนิน สเตอรอยด์ เทอร์พีนอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์
3. ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH assay) จากการทดสอบเชิงคุณภาพ ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์ลิควิดโครมาโทกราฟี (Thin layer liquid chromatography, TLC)
4. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี Agar Disc Diffusion

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทำให้ทราบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ของส่วนสกัดหยาบจากส่วนดอกและใบของเพกา
2. ทำให้ทราบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของส่วนสกัดหยาบจากดอกและใบของเพกา
3. เป็นแนวทางในการพัฒนาด้านการศึกษาสารเคมีที่สำคัญของพืชชนิดอื่น ๆ ต่อไป
4. เป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตยา เครื่องสำอาง เป็นต้น

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. สมุนไพร ตามพระราชบัญญัติยา หมายถึง ยาที่ได้จากพืช สัตว์ หรือแร่ ซึ่งยังไม่ได้ผสมปรุง หรือเปลี่ยนสภาพ เช่น พืชก็ยังเป็นส่วนของ ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล ฯลฯ ซึ่งยังไม่ได้ผ่านขั้นตอนการแปรรูปใด ๆ
2. สารสกัดหยาบ (Crude extract) หมายถึง สารสกัดเบื้องต้นจากสมุนไพรที่ยังไม่ถึงขั้นสารบริสุทธิ์ กรรมวิธีการสกัดไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถนำไปใช้ได้โดยตรงหรือต้องผ่านกรรมวิธีผลิตก่อนที่จะนำไปใช้ประโยชน์
3. องค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) เป็นการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากพืชโดยใช้ระยะเวลาน้อย ทำได้ง่าย รวดเร็ว และใช้เครื่องมือน้อยที่สุด โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมีง่าย ๆ หรือใช้ปฏิกิริยาการเกิดสี (Color reaction) ซึ่งจะให้ผลเป็นสีต่าง ๆ หรือการเกิดตะกอน เพื่อบอกถึงกลุ่มสารเคมีที่สำคัญ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน ซาโปนิน แทนนิน โฟลบาแทนนิน เทอร์พีนอยด์ สเตอรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

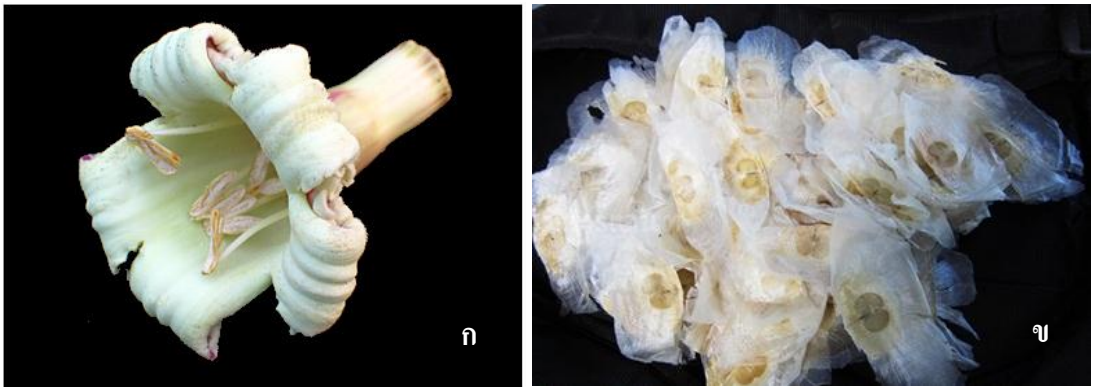
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข้อมูลพฤกษศาสตร์ของเพกา (*Oroxylum indicum*)

เพกาเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมในอินเดียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย โดยพบขึ้นอยู่ตามธรรมชาติในป่าเบญจพรรณและป่าชื้นทั่ว ๆ ไป มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oroxylum indicum* จัดอยู่ในวงศ์ Bignoniaceae มีชื่อสามัญว่า Broken bone, Damocles tree, Indian trumpet flower, Indian trumpet tree มีชื่อเรียกแตกต่างไปตามท้องถิ่น เช่น กาโด้โด้ง ด๊อกก๊ะ ดอก๊ะ ดุแก เบโก มะลิดไม้ มะลิ้นไม้ ลิดไม้ ลิ้นฟ้า หมากลิ้นก้าง หมากลิ้นช้างและอึ่งกา เป็นต้น (สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) เพกามีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ คือ ไม้ยืนต้น กิ่งผลัดใบหรือไม่ผลัดใบ สูง 5-12 เมตร เรือนยอดเล็ก กิ่งเปราะหักง่าย แตกกิ่งก้านน้อย ต้นที่มีอายุน้อยมีกิ่งใหญ่ตรงกลางกิ่งเดียว เปลือกเรียบ มีใบเป็นกลุ่มตรงกลาง คล้ายกับต้นปาล์ม ภายหลังจากออกดอก ลำต้นจะแยกเป็นกิ่งระเกะระกะ เปลือกต้นสีน้ำตาลครีมอ่อน หรือเทาอ่อน แตกเป็นสะเก็ดสี่เหลี่ยม และแผลของใบยาวถึง 150 เซนติเมตร เกิดจากใบที่ร่วงไปแล้ว ลำต้นและกิ่งก้านมีรูระบายอากาศ กระจายอยู่ทั่วไป เปลือกลำต้นเรียบสีเทา มีรอยแผลเป็น จากการหลุดร่วงของใบ ใบประกอบ แบบขนนก 3 ชั้น ปลายคี่ ใบขนาดใหญ่ ยาว 60-200 เซนติเมตร เรียงตรงข้ามกันอยู่บริเวณปลายกิ่ง ใบย่อยรูปไข่ หรือรูปไข่แกมวงรี กว้าง 4-8 เซนติเมตร ยาว 6-12 เซนติเมตร ปลายยาว ขอบใบเรียบ ฐานใบสอบแคบ ใบเกลี้ยง หรือมีขนสีขาวสั้น ๆ ด้านล่าง ท้องใบนวล ก้านใบบนสุดแยกออก 1 ครั้ง ก้านใบกลางแยก 2 ครั้ง และก้านใบล่างแยก 3 ครั้ง ทำให้เห็นใบทั้งหมดเป็นรูปสามเหลี่ยม ก้านใบย่อยยาว 5-8 มิลลิเมตร ก้านใบข้างและก้านใบร่วมโค้งพองออกที่ฐานและที่ข้อ ก้านใบยาว 0.5-2 เมตร ดอก ช่อขนาดใหญ่แบบกระจะออกที่ปลายยอดเป็นกระจุก มีดอกย่อย 20-35 ดอก จะบานพร้อมกันคราวละ 2-3 ดอก ก้านช่อดอกยาว 60-180 เซนติเมตร ยื่นออกมานอกทรงพุ่มของยอด ดอกย่อยขนาดใหญ่ 8-12 เซนติเมตร กลีบดอกสีนวลแกมเขียวโคนกลีบเป็นหลอดสีม่วงแดง หรือม่วงด้านนอก หลอดกลีบดอกยาว 2-4 เซนติเมตร รูปแตร กลีบดอกหนา ขอบย่น ไม่มีพู หรือพูไม่เท่ากัน มีต่อมกระจายอยู่ด้านนอกด้านในมีขนหนาแน่น ดอกบานตอนกลางคืน มีกลิ่นสาบฉุน และร่วงตอนเช้า มักจะมีดอกและผลในกิ่งเดียวกัน เกสรตัวผู้ 5 อัน ติดกับหลอดดอก โคนก้านมีขน เกสรตัวเมียมี 1 อัน กลีบเลี้ยงยาว 2-4 เซนติเมตร มีกลีบเลี้ยง 5 กลีบ เชื่อมติดกันเป็นรูปทรงกระบอก ปลายไม่แยกเป็นกลีบอย่างเด่นชัด เมื่อเป็นผล กลีบเลี้ยงนี้จะเจริญเป็นเนื้อแข็งมาก ออกดอกช่วงเดือนมีนาคมถึงกรกฎาคม

ผลเป็นฝัก แบนโค้งเล็กน้อยที่ฐาน มีสันเล็ก ๆ ที่ด้านข้างคล้ายรูปลิ้นห้อยอยู่เหนือเรือนยอด กว้าง 6-10 เซนติเมตร ยาว 30-120 เซนติเมตร สีน้ำตาลเข้ม สีแดง ติดฝักยาก ฝักเป็นรูปดาบ เมื่อแก่จะแตกเป็น 2 ซีก เมล็ดแบน สีขาว ขนาด 4-8 เซนติเมตร มีปีกบางโปร่งแสง พบบริเวณป่าเต็งรัง ป่าทุ่ง ป่าผสมผลัดใบ บริเวณ ไร่ สวน (อุดมการณ์ อินทุใสและปาริชาติ ทะนานแก้ว, 2549)

ส่วนต่าง ๆ ของเพกาสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วน มีสรรพคุณในการบำรุงร่างกาย นำมาปรุงเป็นยารักษาโรคหรือใช้เป็นอาหารได้ เช่น ราก ใช้บำรุงธาตุ ทำให้เกิดน้ำย่อยอาหาร เจริญอาหาร แก้ท้องร่วง แก้บิด แก้ไข้สันนิบาต ใช้ภายนอก รากฝนกับน้ำปูนใส ทาแก้อาการอักเสบ ฟกบวม ใบ ต้มน้ำดื่ม แก้ปวดท้อง ขับลม บรรเทาอาการปวดไข้ และยังช่วยให้เจริญอาหาร ฝักอ่อน ใช้รับประทานเป็นผัก ช่วยในการขับผายลม ขับเสมหะ บำรุงธาตุ เมล็ด ใช้เป็นยาถ่าย เมล็ดแก่ใช้เป็นยาระบาย แก้ไอ ขับเสมหะ โดยต้มเมล็ด 1 กำมือ กับน้ำ 300 ซีซี. จนเดือด ให้เนื้อยาออกมา ดื่มวันละ 3 ครั้ง เปลือกต้น รสฝาดเย็น และขมเล็กน้อย เป็นยาสมานแผล ทำน้ำเหลืองให้เป็นปกติ ขับน้ำ เหลืองเสีย ขับเลือดดับพิษโลหิต บำรุงโลหิต แก้เสมหะจุกคอ ขับเสมหะ แก้บิด แก้อาการจุกเสียด เพกาทั้ง 5 คือการใช้ส่วนราก ใบ ดอก ผล ต้น รวมกันจะมีรสฝาดเย็น มีสรรพคุณสมานแผล แก้อักเสบบวม แก้ท้องร่วง บำรุงธาตุ แก้น้ำเหลืองเสีย (คณะกรรมการกลุ่มผลิตชุดวิชาเภสัชพฤกษศาสตร์, 2547)



ภาพที่ 2-1 ส่วนต่าง ๆ ของเพกา (ก) ดอกเพกา (ข) เมล็ดเพกา (อ้างอิงจาก http://topicstock.pantip.com/jatujak/topicstock/J3707918/J3707918-4.jpg วันที่ค้นข้อมูล 25 เมษายน 2559)

ภาพที่ 2-2 ส่วนต่าง ๆ ของเพกา (ก) ฝักอ่อน (ข) เปลือกต้นเพกา (ค) ใบเพกา (ง) ฝักแก่
(อ้างอิงจาก http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=84
วันที่ค้นข้อมูล 25 เมษายน 2559)

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร (นันทวัน บุณยะประภัศร, 2544)

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

การเตรียมตัวอย่างพืชนับเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญ ซึ่งต้องคำนึงถึงสิ่งที่มีผลต่อความแตกต่างของสารสำคัญในพืช ได้แก่ การตรวจเอกลักษณ์ที่ถูกต้องของพืช เพื่อให้ได้ชื่อพฤกษศาสตร์ และได้ตัวอย่างที่ถูกต้อง ไม่มีพืชอื่นปน เพราะจะทำให้ได้สารแปลกปลอม ซึ่งอาจเป็นอันตรายได้นอกจากนี้ยังทำให้ผลการวิจัยผิดพลาดได้ พืชต้องไม่มีโรค หากตัวอย่างที่เก็บมามีจุลินทรีย์อันเป็นสาเหตุของโรคพืช จุลินทรีย์อาจให้สารซึ่งถูกสกัดออกมาพร้อมกับสารที่เราต้องการ นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการชีวสังเคราะห์ในพืชทำให้ได้สารที่แตกต่างออกไปจากธรรมชาติ ความแตกต่างของสารสำคัญในพืช (Variation of constitu-ents) ในการเก็บ

พืชแต่ละครั้งสารสำคัญในพืชอาจแตกต่างกันทั้งปริมาณและชนิด ซึ่งเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่นความแตกต่างเนื่องจากสายพันธุ์ แหล่งที่ปลูก เป็นต้น ดังนั้นจึงควรต้องบันทึก สถานที่ และเวลาที่เก็บตัวอย่างพืช สำหรับผลของการเก็บรักษาและเตรียมพืช (Effect of preserving and processing process) ในการทำพืชให้แห้งบางครั้งจะทำให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรเสียไป เช่น ไธม์ (thyme) สดมีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ แต่ถ้าตัวอย่างแห้งฤทธิ์ทางเภสัชวิทยานี้จะหมดไป

2. วิธีการสกัดสารสำคัญจากพืช

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสารสกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ ดังนี้

2.1 มาเซอเรชัน (Maceration หรือ Immersion) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ปากขวดกว้าง หรือถังสเตนเลส เป็นต้น ทิ้งไว้ประมาณ 5-7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อย ๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อย ๆ รินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก (Marc) ให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้นำไปกรอง การสกัดถ้าจะสกัดให้หมดจด (Exhausted) อาจจำเป็นต้องสกัดซ้ำหลาย ๆ ครั้ง วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

2.2 เพอร์โคเลชัน (Percolation) เป็นวิธีการสกัดสาระสำคัญแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า เพอร์โคเลเตอร์ (Percolator) นำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายพอชื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อย ๆ บรรจุผงยาที่ละน้อยเป็นชั้นในเพอร์โคเลเตอร์ เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพร (Solvent head) ประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไขเอาสารสกัดออกมา โดยค่อย ๆ เติมตัวทำละลายเหนือสมุนไพรอย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดจนการสกัดสมบูรณ์ บีบกากเอาสารสกัดออกให้ได้มากที่สุด นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกัน นำไปกรอง วิธีนี้อาจพบปัญหา ผลยาอาจจับตัวเป็นก้อนทำให้ตัวทำละลายไม่สามารถแทรกซึมเข้าไปสกัดได้ การพองตัวมาก ๆ ทำให้ต้องใช้ความดัน และอาจทำให้อุดตัน การบรรจุไม่สม่ำเสมอจะเกิดร่องซึ่งตัวทำละลายจะไหลผ่านร่องแทนการแทรกซึมไปตามผงยา ทำให้สกัดไม่สมบูรณ์

2.3 ซอกซ์เลตเอกแทรกเตอร์ (Soxhlet Extracter) เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง โดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในภาชนะระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบอร์ (Thimble) ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายในเอกซ์แทรกติงแซมเบอร์ (Extracting chamber) สูงถึงระดับ สารสกัดจะไหลกลับลงไปในภาชนะด้วยวิธีกาลักน้ำภาชนะนี้ได้รับความร้อนจากฮีทติงแมนเทิล (Heating mantle) หรือหม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไปทิ้งสารสกัดไว้ในภาชนะ ตัวทำละลายเมื่อกระทบคอนเดนเซอร์ (Condenser) จะกลั่น

ตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่ วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนด้วย จึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัว

3. ปัจจัยในการเลือกวิธีการสกัด

การสกัดสารสำคัญในพืชสมุนไพรมีหลายวิธี ซึ่งวิธีการสกัดที่เหมาะสมขึ้นกับปัจจัยหลาย ๆ อย่าง เช่น คุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัด หากต้องการสกัดที่ไม่ใช่สารสำคัญและคุณค่าทางการรักษาน้อย เช่น สารที่ใช้แต่งสี กลิ่น รส ก็อาจใช้วิธีง่าย ๆ ที่ไม่ยุ่งยาก สำหรับความต้องการที่จะให้ได้สารสกัดที่สมบูรณ์ (Exhausted extraction) หรือเกือบสมบูรณ์ หากต้องการสารสกัดเจือจาง การใช้วิธีมาเซอร์เรชัน (Maceration) ก็เพียงพอแล้ว แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นก็ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชัน (Percolation) หรือการสกัดแบบต่อเนื่อง ธรรมชาติของพืชสมุนไพรพิจารณาจากลักษณะและโครงสร้างของเนื้อเยื่อ ถ้าสมุนไพรที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม เช่น ดอกใบ อาจสกัดด้วยวิธีมาเซอเรชัน (Maceration) หากเป็นพืชสมุนไพรที่มีเนื้อเยื่อแข็งและเหนียว เช่น เปลือก รากเนื้อไม้ ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชัน หรือสารสกัดแบบต่อเนื่อง ความสามารถในการละลายของสารสำคัญถ้าละลายได้ดีนิยมใช้วิธีดูดซับ แต่ถ้าละลายได้น้อยก็จำเป็นต้องใช้วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องในความคงตัวของสารสำคัญในสมุนไพรต่อความร้อน ถ้าเป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อน ควรใช้วิธีมาเซอร์เรชันหรือเพอร์โคเลชัน

4. การเลือกใช้ตัวทำละลาย

ในการสกัดจะได้ผลดีหรือไม่ อยู่ที่การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ตัวทำละลายที่ดีควรมีสมบัติ เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่ต้องการได้ดีพอ ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด ไม่เป็นพิษ และมีราคาไม่แพง ตัวทำละลายที่นิยมใช้ เช่น คลอโรฟอร์ม อีเธอร์ เฮกเซน และอัลกอฮอล์ เป็นต้น ซึ่งในการเลือกใช้ตัวทำละลายอาศัยหลักเกณฑ์ดังนี้ คือ สารละลายและตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกัน ละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุด และแรง (Force) ที่เกี่ยวข้องในการละลายที่สำคัญ เช่น แรงการกระจาย หรือแรงลอนดอน (Dispersion force หรือ London force) แรงดึงดูดระหว่างขั้ว (Dipole-dipole force) และพันธะไฮโดรเจน (H-bonding)

5. การทำสารสกัดให้เข้มข้น

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้มักจะมีปริมาตรมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกส่วนได้ไม่สะดวก และไม่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนซึ่งมีหลายวิธี ดังนี้

5.1 การระเหย (Free Evaporation) คือ การระเหยให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (Water bath) หรือเครื่องให้ความร้อน (Hot plate) บางครั้งอาจจะเป่าอากาศร้อนลงไปในสารสกัดด้วยเพื่อให้ระเหยได้เร็วขึ้น

5.2 การกลั่นในภาวะสุญญากาศ (Distillation in vacuo) เป็นวิธีการระเหยแห้งโดยกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (Vaccum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า rotary evaporator ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบที่จะกลั่น (Distillation flask) คอนเดนเซอร์หรือส่วนควบแน่นไอของสารละลาย (Con-denser) และภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่น (Receiving flask) โดยภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบที่จะกลั่นจะหมุนอยู่ตลอดเวลาที่ทำงาน และแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำเพื่อให้การกระจายของความร้อนทั่วถึงและสม่ำเสมอ เครื่องมือที่มีต้องมีระบบการทำสุญญากาศที่ดี ระยะระหว่าง ภาชนะบรรจุสารสกัดหยาบที่จะกลั่น และคอนเดนเซอร์ สั้น และมีระบบทำความเย็นของคอนเดนเซอร์ที่ดี

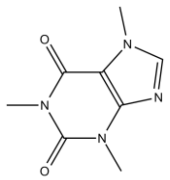
5.3 การแช่แข็ง (Freezing) ถ้าเป็นสารสกัดด้วยน้ำ วิธีที่เหมาะสมคือใช้วิธีแช่แข็งโดยการใช้ความเย็น (Lyophilizer หรือ Freeze dryer) เฉพาะตัวทำละลายเท่านั้นที่แข็ง ซึ่งแยกจาก Concentrated extract โดยการเหวี่ยง วิธีนี้มีข้อดีเหมาะสมกับสารที่สลายตัวง่ายด้วยความร้อน

5.4 อัลตราฟิลเทรชัน (Ultrafiltration) เป็นการทำสารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้แผ่นเมมเบรน (Membrane) ใช้กับสารที่มีมวลโมเลกุล (Molecular weight) สูงกว่า 5,000

พฤกษเคมีเบื้องต้น (วันดี กฤษณพันธ์, 2544)

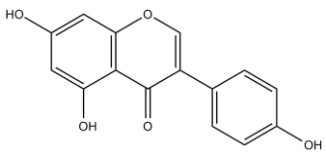
กลุ่มสารเคมีที่พบในพืชมีจำนวนมาก สามารถแบ่งกลุ่มสารเคมีในพืชตามสารตั้งต้น (Biosynthetic origin) ของสารเหล่านี้ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ สารปฐมภูมิ (Primary metabolites) และสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) สารปฐมภูมิ เป็นสารเคมีพื้นฐานที่พบในพืชชั้นสูงโดยทั่วไป พบได้ในพืชเกือบทุกชนิด เป็นกลุ่มสารที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมที่จำเป็น (Essential metabolism) ของเซลล์ ส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช และกระบวนการชีวสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิด สารปฐมภูมิ เช่น คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates) ไขมัน (Lipids) โปรตีน (Protein) กรดอะมิโน (Amino acid) และเอนไซม์ (Enzymes) ส่วนสารทุติยภูมิ เป็นสารประกอบที่พบแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด สารเหล่านี้เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ มักจะแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามสารทุติยภูมิก็ยังเกี่ยวข้องในวงจรเมแทบอลิซึมพื้นฐานในเซลล์สิ่งมีชีวิต สารทุติยภูมิสามารถแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ ดังนี้

1. อัลคาลอยด์ (Alkaloids) เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ มักพบมากในพืชชั้นสูงมีสูตรโครงสร้างซับซ้อนและแตกต่างกันมากมาย ปัจจุบันพบอัลคาลอยด์มากกว่า 5,000 ชนิด คุณสมบัติของอัลคาลอยด์ ส่วนใหญ่มักมีรสขม เป็นผลึกไม่มีสี สามารถรวมตัวกับทั้งกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ อยู่ในรูปของเกลือ ในธรรมชาติมักพบอยู่ในรูปเกลือของกรดอินทรีย์ในรูปอิสระ (Free base) จะไม่ละลายน้ำ หรือละลายได้เพียงเล็กน้อย แต่สามารถละลายน้ำได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ อัลคาลอยด์มีประโยชน์ในการรักษาโรคต่าง ๆ มากมาย ตัวอย่างเช่น Caffeine ที่พบในชาและกาแฟ



ภาพที่ 2-3 สูตรโครงสร้างของ Caffeine

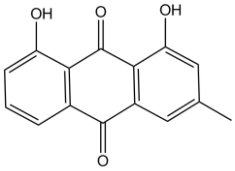
2. ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นสารประกอบโพลีฟีนอลิก (Polyphenolic compound) จำพวกฟีนิลโครโมน (Phenyl choromones) พบมากในธรรมชาติโดยมักพบเป็นเม็ดสี (Pigment) ในส่วนต่าง ๆ ของพืชโดยเฉพาะในส่วนดอก มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น C_6-C_3-C_6 ส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วย Pyran ring จับกับ 3 Carbon chain และ1 Benzene ring ฟลาโวนอยด์หลายชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ตัวอย่างเช่น Genistein ที่พบมากในถั่วเหลือง



ภาพที่ 2-4 สูตรโครงสร้างของ Genistein

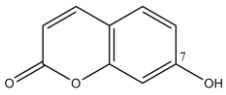
3. แอนทราควิโนน (Anthaquinones) เป็นสารควิโนนที่พบมากที่สุด พบได้ทั้งในรูปอิสระ และกลัยโคไซด์ มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย 3 วงแหวน เป็นสารที่มีสีแดง-ส้ม แต่อาจจะพบได้ตั้งแต่สีเหลือง-น้ำตาล ส่วน Aglycone ของแอนทราควิโนนละลายได้ดีในด่างให้สีชมพู-แดง ละลายได้ในตัวทำละลาย เช่น เบนซีน อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม แอนทราควิโนนเกือบทุกตัวมี

จุดหลอมเหลวสูง ส่วนใหญ่นำมาใช้ประโยชน์เป็นยาระบายและยาถ่าย นอกจากนี้ใช้เป็นสีย้อม ยารักษาเชื้อราที่ผิวหนังอีกด้วย ตัวอย่างเช่น Chrysophanol



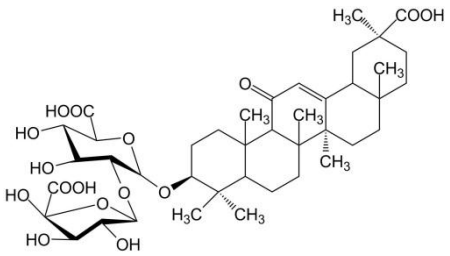
ภาพที่ 2-5 สูตรโครงสร้างของ Chrysophanol

4. คูมาริน (Coumarin) เป็นแลคโทนของ O-hydroxy cinnamic acid ในพืชพบได้ทั้งในรูปอิสระและในรูปกลัยโคไซด์ คูมารินเกือบทั้งหมดในธรรมชาติจะมีออกซิเจนที่ตำแหน่งที่ C-7 (อาจพบในรูปของ hydroxyl หรือ alkoxyl) สารบางตัวระเหยได้ นำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น สารแต่งกลิ่น ยาบำรุงเลือด รักษาโรคด่างขาว ตัวอย่างเช่น Umbelliferone



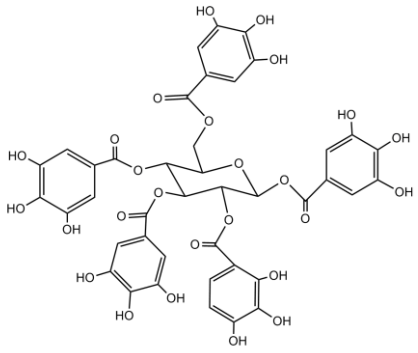
ภาพที่ 2-6 สูตรโครงสร้างของ Umbelliferone

5. ซาโปนิน (Saponins) หรือซาโปนิน กลัยโคไซด์ มีส่วน Aglycone เป็นสารพวก Steroids หรือ Triterpenoids ส่วนนี้จะจับกับส่วนน้ำตาล หรืออนุพันธุ์ของน้ำตาลที่ตำแหน่ง C_3 ได้เป็น O-glycoside ซาโปนินกลัยโคไซด์มีคุณสมบัติบางอย่างคล้ายสบู่ เช่น สามารถเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำ เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ดี และทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ ตัวอย่างเช่น Glycyrrhtzin ซึ่งมี Aglycone เป็น Triterpenoids และมีโมเลกุลของน้ำตาล 2 โมเลกุลเกาะตำแหน่งที่ 3



ภาพที่ 2-7 สูตรโครงสร้างของ Glycyrrhtzin

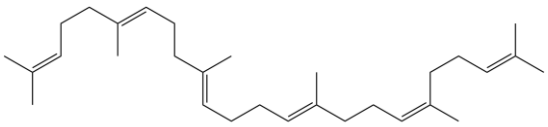
6. แทนนิน (Tannins) เป็นสารจำพวกโพลีฟีนอลิกที่มีโมเลกุลค่อนข้างใหญ่และซับซ้อน พบได้ทั่วไปในพืชเกือบทุกชนิด เป็นสารที่แยกให้บริสุทธิ์ได้ยากเพราะไม่ตกผลึก พบได้ทั้งในรูปอิสระและรูปกลัยโคไซด์ คุณสมบัติและชนิดของแทนนินขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุล แทนนินใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง เนื่องจากแทนนินสามารถตกตะกอนโปรตีนที่หนังสัตว์ได้ หรือใช้เป็นยาฝาดสมาน เป็นส่วนผสมในตำรายาแก้ท้องเสีย หรือใช้กับบาดแผลที่ผิวหนัง เพื่อให้แผลหายเร็วขึ้น ตัวอย่างเช่น Gallotannin



ภาพที่ 2-8 สูตรโครงสร้างของ Gallotannin

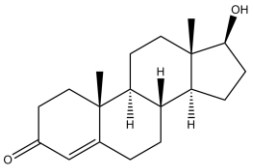
7. เทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) เป็นสารทุติยภูมิที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ ประกอบด้วยหน่วยที่เล็กที่สุด เรียกว่า Isoprene unit ซึ่งเป็นสายโซ่กิ่ง (Branch chain)ของคาร์บอน 5 อะตอม เทอร์พีนอยด์ มีโครงสร้างได้หลายแบบ และมีหมู่ฟังก์ชัน (Functional group) แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับการจัดเรียงตัวของคาร์บอนใน **Isoprene unit** การปิดวงแหวน และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation reaction) หรือปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction reaction)

เทอร์พีนอยด์ส่วนใหญ่ละลายได้ดีในไขมัน ไม่มีสี พบได้ในไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) ของเซลล์ หรือเนื้อเยื่อพิเศษ ตัวอย่างเช่น Squalene ที่พบมากในปลาฉลาม



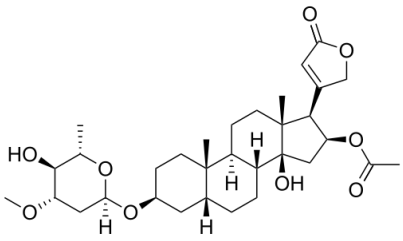
ภาพที่ 2-9 สูตรโครงสร้างของ Squalene

8. สเตอรอยด์ (Steroids) เป็นสารที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น Cyclopentanoperhydrophenanthrene สารจำพวกสเตอรอยด์มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารในกลุ่ม Trtracyclic Triterpenes มาก เป็นกลุ่มสารที่มีความสำคัญเนื่องจากนำใช้ประโยชน์เป็นยาลดการอักเสบ ยารักษาโรคหัวใจ ยาขับปัสสาวะ ตลอดจนนำมาสังเคราะห์เป็นฮอร์โมนเพศ และยาคุมกำเนิด ตัวอย่างเช่น Testosterone ซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศชาย



ภาพที่ 2-10 สูตรโครงสร้างของ Testosterone

9. คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides) เป็นไกลโคไซด์ที่ออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อหัวใจ โดยไปเพิ่มแรงบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ ใช้รักษาโรคหัวใจวาย ผลการรักษาขึ้นอยู่กับชนิดของ aglycone และจำนวนของน้ำตาล น้ำตาลจะช่วยให้คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ละลายได้ดีขึ้น เป็นผลให้การดูดซึมและการกระจายตัวของสารในร่างกายเพิ่มขึ้น จึงช่วยให้การออกฤทธิ์ของสารดียิ่งขึ้น ตัวอย่างเช่น Oleandrin พบในยี่โถ



ภาพที่ 2-11 สูตรโครงสร้างของ Oleandrin

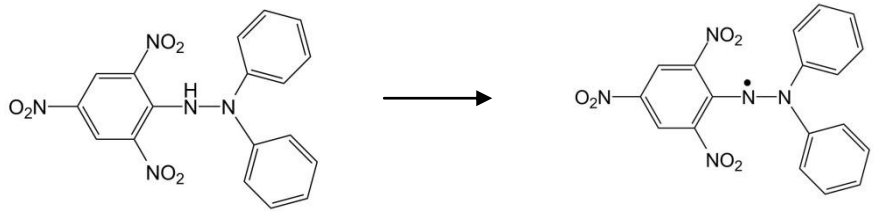
อนุมูลอิสระ (Free radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ อยู่ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุด (Outer orbital) เนื่องจากการมีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยว (Unpaired electron) อยู่ในวงโคจรของโมเลกุล ทำให้ไม่เสถียร ทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดมาใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain reaction) ต่อกันไปเรื่อย ๆ โดยที่อนุมูลอิสระก็มีสมบัติเหมือนสารทั่ว ๆ ไป ตรงที่ความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง (pH) และความชื้นเป็นต้น อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะที่เป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระ คืออิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล $R^{\bullet}$ แทนอะตอมหรือโมเลกุลของอนุมูลอิสระที่ไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นประจุบวก ($R^{+\bullet}$) เช่น อนุมูล pyridinyl ($NAD^{+\bullet}$) และประจุลบ ($R^{-\bullet}$) เช่น อนุมูล superoxide ($O_2^{-\bullet}$) หรือเป็นกลาง เช่น อนุมูล peroxyl ($ROO^{\bullet}$) หรืออนุมูล thiyl ($RS^{\bullet}$) เป็นต้น อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพได้แก่ Hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$) และ Superoxide anion ($O_2^{-\bullet}$) เป็นต้น อนุมูลเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก หรือการเกิดภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (Oxidative stress) คือ การที่อนุมูลอิสระเกิดขึ้นใน ปริมาณมากเกินกว่าที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมด ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่าง ๆ เช่นโรคหลอดเลือดอุดตัน เป็นสาเหตุร่วมกับการเกิดมะเร็ง ทำให้ผิวหนังเกิดรอยเหี่ยวย่น เป็นต้น (Kaewamatawong & Jounmunkong, 2006)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ สารเหล่านี้มี กลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ดักจับ (Scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (Chelate) กับโลหะ เพื่อป้องกัน

การสร้างอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารประกอบที่ทนต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์ โดยทั่วไป สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน (Nitrogen compounds) และแคโรทีนอยด์ (Catotinoid) บทบาทสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระคือ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ของมนุษย์ การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านอนุมูลอิสระได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากอนุมูลอิสระส่งผลเสียต่อร่างกายและเป็นสาเหตุสำคัญ ของการเกิดโรคหลายชนิดในมนุษย์ เช่น โรคมะเร็ง ความดันโลหิตสูง เบาหวาน รูมาตอยด์ (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554)

วิธีการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant assay) มีอยู่ด้วยกันมากมายหลายวิธี แต่มีอยู่หนึ่งวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ วิธี DPPH scavenging assay โดย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นได้สารละลาย DPPH จะมีสีม่วงดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อ DPPH ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จะทำให้เปลี่ยนจากสารละลายสีม่วงเป็นสารละลายสีเหลือง (ระวิวรรณ แก้วอมตวงค์ และทรงพร จึงมั่นคง, 2549) ดังภาพที่ 2-12



สีม่วง สีเหลือง

ภาพที่ 2-12 แสดงปฏิกิริยาการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH

เชื้อแบคทีเรียและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดจากสมุนไพร

1. เชื้อแบคทีเรีย

เนื่องจากอาหารแต่ละชนิดมีองค์ประกอบที่ไม่เหมือนกันและจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีการผลิตเอนไซม์ แตกต่างกัน ฉะนั้นการเน่าเสียของอาหารจึงเกิดจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน ส่วนใหญ่แล้วการเน่าเสียของอาหารมักเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียนั้นเป็นจุลินทรีย์ที่พบได้อย่างกว้างขวางในธรรมชาติรวมทั้งในอาหาร แบคทีเรียมักทำให้อาหารสด เช่น นมสด ไข่ อาหารทะเล เกิดการเน่าเสีย ซึ่งการเน่าเสียของอาหารนั้นเกิดจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนใน

อาหาร การที่แบคทีเรียจะเติบโตในอาหารได้หรือไม่นั้นขึ้นกับปัจจัยภายในอาหาร เช่น สารอาหาร ค่า pH ความชื้น ปริมาณออกซิเจนและโครงสร้างทางชีววิทยาของอาหารหรือสารยับยั้งในอาหาร เป็นต้น นอกจากนั้นยังขึ้นกับปัจจัยภายนอก เช่น อุณหภูมิที่เก็บอาหาร ความชื้นสัมพัทธ์ และปริมาณก๊าซ เป็นต้น (คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี การอาหาร, 2539)

แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ อาหารเกิดการเน่าเสีย ได้แก่

ก. *Staphylococcus aureus:* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ย้อมติดสีม่วงของแกรมบวก (Gram-positive) ลักษณะของเซลล์เป็นรูปกลม (Cocci) เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น เป็นพวก facultative anaerobic นั่นคือสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โคโลนีของเชื้อนี้บนอาหารแข็งมีสีเหลืองอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ 35-37 องศาเซลเซียส เชื้อนี้สามารถเจริญได้ดี ในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะอาหารที่มีโปรตีนและอาหารที่ประกอบด้วยส่วนผสมหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีเกลือแกงหรือน้ำตาลสูง โดยมีความทนทานต่อเกลือสูงถึงร้อยละ 10 อาหาร ที่เคยพบการปนเปื้อนของเชื้อนี้ คือ สลัดต่าง ๆ ผลิตภัณฑ์ขนมอบ อาหารประเภทเนื้อและของหมัก อาการของผู้ได้รับเชื้อนี้เกิดรวดเร็วรุนแรง และเฉียบพลัน โดยทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพความต้านทานสารพิษของร่างกาย ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อในอาหาร และปริมาณสารพิษที่ เชื้อสร้างขึ้นในอาหาร รวมทั้งสภาพร่างกายโดยทั่วไปอาการของผู้ที่ ได้รับเชื้อคือ ผู้ป่วยมี อาการคลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้องและอ่อนเพลีย

ข. *Bacillus cereus:* เป็นเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Bacillaceae มีรูปร่างแท่ง ติดสีแกรมบวก มีการเรียงตัวเป็นสายยาว ขนาดความกว้างของเซลล์ นั้นมากกว่าหรือเท่ากับ 0.9 ไมโครเมตรและมีสปอร์ที่ทนความร้อนสูงขนาดเล็กทำให้เซลล์มีรูปร่างไม่เปลี่ยนแปลง เป็นแบคทีเรียพวกAerobe หรือ facultativeanaerobe อุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญเติบโตได้ คือ ไม่เกิน 75 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญเติบโตได้ คือ 3 องศาเซลเซียส สามารถทนเกลือที่มี ความเข้มข้นร้อยละ 12 มักเป็นสาเหตุ ของการเน่าเสียในอาหารจำพวกที่มีแป้งและโปรตีนเป็นส่วนประกอบ อาจพบในซอสและซุปต่าง ๆ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) เชื้อชนิดนี้สามารถสร้าง Enterotoxin ได้ 2 ชนิด ชนิดหนึ่งทนต่อความร้อน (Heat stable) เป็นสาเหตุ ให้เกิดอาการอาเจียนส่วนอีกชนิดหนึ่งถูกทำลายได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน (Heat labile) เป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการโรคอุจจาระร่วง

ค. *Escherichia coli:* เป็นเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Enteroloacteriaceae ย้อมติดสีแดงของแกรมลบ (Gram negative) เป็นเซลล์รูปแท่งท่อนสั้น ๆ สามารถเคลื่อนที่ ได้โดยใช้ Flagella รอบเซลล์เจริญเติบโตได้ดี บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปเป็นพวก Facultative anaerobe เช่นเดียวกับ *S.aureus* อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ 35-37 องศาเซลเซียส สามารถผลิต

กรดอินทรีย์ (เช่น กรดแลคติก) แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และแก๊สไฮโดรเจนได้ โดยการย่อยสลายกลูโคส ถ้าผู้ บริโภคได้รับประทานอาหารที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนอยู่ จะทำให้เกิดอาการของโรคอุจจาระร่วง คือ ถ่ายเป็นน้ำ หรือถ่ายเหลวบ่อยครั้ง และมักพบอาการเป็นไข้และอาเจียนร่วมด้วย (สุวิมล กีรติพิบูล, 2546)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากสมุนไพร ได้ดัดแปลงวิธี การมาจากการทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ ต่อสารต้านจุลินทรีย์หรือยาปฏิชีวนะ(Koneman, Allen, Janda, Schreckenberger, & Washington, 1994) ซึ่งสามารถแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 วิธี คือ Dilution Method และ Diffusion Method มี รายละเอียด ดังนี้

Dilution Method

เป็นวิธีหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลินทรีย์ ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเรียกความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์นี้ว่า Minimal Inhibition Concentration หรือ MIC ซึ่งการวิเคราะห์หา MIC สามารถทำได้โดยการเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธี (Ingraham & Ingraham, 1995) คือ การเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ ในของเหลว (Broth Dilution Method) และการเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารแข็ง (Agar Dilution Method) ซึ่งDilution Method จะให้ผลที่ละเอียดกว่า Diffusion Method แต่ขณะเดียวกันก็ต้องใช้เวลาเครื่องมือ และแรงงานในการทำการทดลองมากกว่า

Diffusion Method

เป็นวิธีการทดสอบความไวของสารต้านจุลินทรีย์ในการยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะอาศัยหลักการที่ ว่าสารจะซึมจากที่มีความเข้มข้นสูงไปยังที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้น จึงนำสารต้านจุลินทรีย์ ซึ่งอยู่ในรูปแผ่นยาที่ เป็นกระดาษกรองหรือเม็ดยาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด นั่นคือวิธีที่ ใช้แผ่นกระดาษกรอง (Disc Diffusion Method หรือ Filler Paper Disc) และการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นสามารถสังเกตได้จากการที่จุลินทรีย์จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในบริเวณโดยรอบที่มีสารต้านจุลินทรีย์อยู่เป็นที่นิยมกันมาก (Tortora, Berdell, & Christine, 1995) เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ประหยัดค่าใช้จ่าย และใช้ เวลาทดลองน้อย แต่วิธีนี้ไม่สามารถอ่านผลได้โดยตรงเป็นค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

จากที่ กล่าวมาแล้วนั้น จะเห็นได้ว่าการที่จะเลือกการทดสอบวิธีใดนั้น จะต้องพิจารณาจากความละเอียดที่ผู้ทดลองต้องการจำนวนสารสกัดที่จะทดสอบหาปริมาณของสารสกัดที่มีอยู่นั้น ตลอดจนแรงงาน งบประมาณที่ใช้ในการทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์ โดย Diffusion Method

เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบความไวในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลินทรีย์ วิธีการนี้มักทำการทดสอบกับสารต้านจุลินทรีย์เพียงความเข้มข้นเดียวเท่านั้น โดยอาศัยหลักการที่ว่า เมื่อใส่สารต้านจุลินทรีย์ปริมาณหนึ่งไว้ในภาชนะบรรจุ(Reservoir) ซึ่งอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar Medium) ที่ เพาะเชื้อจุลินทรีย์ไว้ ภายหลังจากการบ่มเพาะเชื้อ ให้สังเกตดูรอบ ๆ บริเวณภาชนะที่ตัวสารต้านจุลินทรีย์ซึมไปนั้นจะมีบริเวณใส (Clear Zone) ที่ไม่มีเชื้อเจริญเติบโตโดย บริเวณใสนี้จะเรียกว่า Inhibition Zone แล้ววัดขนาดบริเวณใสที่ เกิดขึ้น เพราะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่ เกิดขึ้นนั้นจะมี ขนาดแคบและกว้างแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้นนั้น จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบอีกด้วย (Mckane & Kandel, 1996)

ในอดีตนั้น Diffusion Method เริ่มต้นด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน แล้วใช้แท่งแก้วหรือแท่งเหล็กเจาะบนผิววุ้นให้มีช่องเกิดขึ้น จากนั้นเติมสารละลายของสารต้านจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ใส่ลงไปในช่องวุ้นเหล่านั้น สารต้านจุลินทรีย์จะแพร่กระจายไปในเนื้อวุ้น โดยสารต้านจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ชนิดนั้น จุลินทรีย์จะไม่เจริญบริเวณรอบ ๆ บริเวณที่มีสารต้านจุลินทรีย์ดังกล่าวอยู่ ซึ่งหากมีบริเวณใดที่ถูกยับยั้งมากนั้น หมายถึง สารต้านจุลินทรีย์หรือยาชนิดนั้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดนั้นมาก ต่อมาในปี ค.ศ. 1960 ได้มีการพัฒนาวิธีการใหม่โดยใช้แผ่นกระดาษกรองหรือกระดาษกรองวงกลม (Filter Paper Disc) ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้กันมาก บางครั้งอาจเรียกวิธีการทดสอบที่ใช้แผ่นกระดาษดังกล่าวนี้ว่า Kirby-Bauer Test หรือ Disc Sensitivity Test (Alcamo, 1997)

ดังจะเห็นได้ว่า Diffusion Method เป็นวิธีที่ นิยมใช้กันมากในการทดสอบความไวต่อจุลินทรีย์ของสารต้านจุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ใช้ค่าใช้จ่าย แรงงานและเวลาในการทำการทดลองน้อย แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดหลายประการด้วยกัน อาทิ เช่น วิธีนี้ไม่สามารถใช้ในการทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งมีอัตราเร็วในการเจริญเติบโตต่ำหรือเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต และเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้เฉพาะแต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิด นอกจากนี้วิธีการทดสอบนี้ยังไม่สามารถอ่านผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้โดยตรง

ปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์ โดย Diffusion Method

ปัจจัยหลายชนิดที่มี ผลต่อขนาดบริเวณใสที่ เกิดจากสารต้านจุลินทรีย์นั้น โดยบางปัจจัยจะรบกวนการออกฤทธิ์หรือการดูดซึมของสารต้านจุลินทรีย์ หรืออาจมีบางปัจจัยที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์มากก็จะทำให้ขนาดบริเวณใสลดลงได้ ส่วนบางปัจจัยที่ส่งเสริม

การออกฤทธิ์หรือการดูดซึมสารต้านจุลินทรีย์ หรือพวกที่รบกวนการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก็จะทำให้บริเวณใสนี้เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงควรตระหนักถึงปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ ซึ่งปัจจัยที่สำคัญ มีดังนี้

อาหารเลี้ยงเชื้อ

สารต้านจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ นั้นจะถูกกระทบจากส่วนประกอบต่าง ๆ ที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน โดยมีตัวอย่างดังนี้

1. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น จะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ส่วนมากจะเจริญเติบโตได้ดี ที่ 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 pneumophila สามารถอยู่ได้ที่ pH 6.85-7.00 ดังนั้น จึงต้องใช้บัฟเฟอร์ช่วยเพื่อไม่ให้ ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ๆ เปลี่ยนแปลงไปมากนัก (Nester, Evans, & Martha, 1995)

3. ปริมาณไอออนที่ปรากฏในอาหารเลี้ยงเชื้อ 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 จึงมี ผลทำให้การออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์นั้นลดลงได้ 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 ที่ เท Agar ไว้แล้ว ถ้าต้องการเก็บไว้ใช้เกิน 5 วัน ควรใส่ถุงพลาสติกแล้วไว้ในที่มีอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส แต่ไม่ควรเก็บเกิน 2 สัปดาห์ และก่อนใช้ควรให้พื้นผิว Agar แห้งเสียก่อน (Collins, Lyne, & Grange, 1989)

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

ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ ในการทดสอบ

ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ ในการทดสอบนั้น มีผลต่อการทดสอบเป็นอย่างมาก เช่น การใช้เชื้อจุลินทรีย์มากเกินไปจะทำให้บริเวณใสมี ขนาดเล็กเกินไปได้ ดังนั้น การทดสอบทุกครั้งจึงต้องมีการปรับปริมาณของเชื้อทดสอบให้อยู่ในปริมาณที่แน่นอนและเป็นมาตรฐาน เช่น การปรับปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบให้ความเข้มข้นประมาณ 1.5×10^9 เซลล์ /มิลลิลิตร โดยเทียบกับ 0.5 McFarland Standard (Koneman et al., 1994)

ความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ ใน Disc ที่ใช้ ทดสอบ

ในกรณีที่ ใช้แผ่นกระดาษกรอง (Disc) ที่มีสารต้านจุลินทรีย์ที่เตรียมขึ้นเอง โดยการชุบ Disc ลงในสารต้านจุลินทรีย์ อาจจะมีผลทำให้ปริมาณความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ใน Disc แต่ละอันแตกต่างกัน และจะส่งผลต่อขนาดของบริเวณใสที่ เกิดจากสารต้านจุลินทรีย์ได้โดยตรง

อุณหภูมิที่ใช้ ในการบ่มเชื้อ

อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ มีผลกระทบอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยปกติจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดี ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (Psychrophilic Bacteria) และแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 75 องศาเซลเซียส (Thermophilic Bacteria) และแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ ประมาณ 20-45 องศาเซลเซียส (Mesophilic Bacteria) ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียที่สามารถก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์ เช่น *Salmonella typhi* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น ดังนั้นแล้ว อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจึงควรปรับอุณหภูมิ ให้เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิดโดยในกรณีทดสอบความไวของจุลินทรีย์ที่สามารถทำให้เกิดโรคในมนุษย์ จะใช้อุณหภูมิ ในการบ่มเชื้อประมาณ 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 ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดสภาวะกรดขึ้น ซึ่งจะมีผลต่อจุลินทรีย์และการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์บางชนิด (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2536)

การวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น

การวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นมีความสำคัญอย่างยิ่งที่จะทำให้ผลที่แปรออกมาผิดหรือถูกได้เช่นกัน โดยทั่วไปการวัดขนาดบริเวณใสต้องการความละเอียดเป็นค่ามิลลิเมตร ซึ่งจะวัดได้โดยใช้ไม้บรรทัดคาลิปเปอร์หรือเครื่องมือไฟฟ้า และการที่ขอบบริเวณส่วนใสไม่ชัดเจน คือ ขอบริม ๆ ที่ยังมีเชื้อจุลินทรีย์ยังเจริญประปราย การวัดขนาดบริเวณใสในลักษณะนี้จะต้องวัดเฉพาะขอบนอกที่ใสสม่ำเสมอ (Ingraham & Ingraham, 1995)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กฤติกา นรจิตร (2548) ทำการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหารของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชวงศ์ขิง 5 ชนิด (ขิงข่า ขมิ้นชัน กระชายและเร่วหอม) โดยการต้มกลั่นและการสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ปิโตรเลียมอีเทอร์ และเอทานอล ผลการวิเคราะห์ องค์ประกอบของสารหอมระเหยด้วย Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS) พบว่า สารประกอบหลักในขิง ได้แก่ Zingiberene และ Farnesene สารประกอบหลักในขมิ้นชัน ได้แก่ Turmerone และ Curlone ในขณะที่สารประกอบหลักของข่าและเร่วหอมที่สกัดด้วยการต้มกลั่น คือ Methyl Chavicol ส่วนที่สกัดด้วยเอทานอล คือ Fraeseol และ Anethole ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยของกระชายที่สกัดด้วยการต้มกลั่นและสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิดมี γ -terpinene และ Geraniol เป็นสารประกอบหลักตามลำดับ การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิดคือ *E. coli, S. aureus, B. aureus* และ *L. monocytogenes* พบว่า น้ำมันหอมระเหยของกระชายและเร่วหอมที่ได้จากการต้มกลั่นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ทุกชนิด ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้อีก 18 ชนิดไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ได้ส่วนน้ำมัน

หอมระเหยของขิงจากการต้มกลั่นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิดได้ดีที่สุด

วาริชัย พิมพ์บุตร, มาระตรี เปลี่ยนศิริชัย, วรัญ แก้วดวงตา, สมศักดิ์ นวลแก้ว และสุจริต ส่วนไพโรจน์ (2554) ได้ศึกษา การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ บี คลอโรฟิลล์ทั้งหมด แคโรทีนอยด์ทั้งหมดและสารประกอบฟีนอล ในใบอ่อนของเพี้ยฟาน เพกา และขี้เหล็กหวาน โดยเก็บตัวอย่างจาก 3 แหล่งในภาคอีสาน สกัดด้วยเอทานอล 80% วัดด้วยเครื่อง spectrophotometer พบว่าใบอ่อนของเพกามีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ บี คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และแคโรทีนอยด์ทั้งหมด 147.29, 47.20, 194.52 และ 43.01 mg/g DW ตามลำดับ ซึ่งใบอ่อนของเพี้ยฟานมีปริมาณสารประกอบฟีนอล 293.15 mg/ g DW สูงกว่าใบอ่อนของเพกาและขี้เหล็กหวานอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65%) พบว่าเก็บได้นาน 3 วัน โดยในพืชทุกชนิดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และสารประกอบฟีนอลลดลงตามอายุการเก็บรักษา ขณะที่ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดค่อนข้างคงที่

วิชุดา กล้าเวช, ฮายาตี เจ๊ะตาเห, ศิญาพร เจ้ยทองศรี และปวีณา ดิกิจ (2554) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และยับยั้งเอนไซม์แอฟากลูโคซิเดส จากสารสกัดทั้งสดและแห้งของผักพื้นบ้าน 9 ชนิด ได้แก่ ใบจิกนา เปลือกเนียง ใบเนียงรอก ฝักเพกา ผลมะเดื่อกรวด ผลมะเดื่องั่ว ผลมะเดื่อชีน้อย ผลมะเดื่อโป๊ะ และผลมะเดื่อฉิ่ง พบว่า สารสกัดจากเพกาแห้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยกำจัดสารต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 92.25 นอกจากนี้การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสโดยเปรียบเทียบกับยารักษาโรคเบาหวาน Acarbose® พบว่า ผลมะเดื่อชีน้อยแห้งที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร มีการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสสูงสุด โดยมีการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสร้อยละ 85.46 และฝักเพกาแห้ง มีการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสร้อยละ 17.62

Rasadah et al. (1998) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยใช้วิธี Disc Diffusion และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดและองค์ประกอบทางเคมีของรากและเปลือกต้นเพกา พบว่าส่วนสกัดชั้นไดคลอมีเทนแยกสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และกลุ่มแนฟโทควิโนน ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ lipoxygenase พบว่าให้ผลการยับยั้งเอนไซม์ lipoxygenase ทั้งในส่วนสกัดของรากและเปลือกต้นเพกาโดยสารที่ใช้เป็นตัวควบคุมคือ Fisetin มีค่า IC_{50} 0.9µg/ mL นอกจากนี้ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียพบว่าส่วนสกัด Lapachol ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* เท่ากันกับ Streptomycin สำหรับสาร Chrysin ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เท่ากันกับ Streptomycin ดังตารางที่ 2-1, 2-2 และ 2-3

ตารางที่ 2-1 โครงสร้างของสารทั้งหมดยืนยันด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

สารประกอบ	ชื่อสาร
สารประกอบ 1 (สารสกัดจากเปลือก)	Dehydro-iso-β-lapachone
สารประกอบ 2 (สารสกัดจากเปลือก)	Baicalein
สารประกอบ 3 (สารสกัดจากเปลือก)	Chrysin
สารประกอบ 4 (สารสกัดจากเปลือก)	Lapachol
สารประกอบ 5 (สารสกัดจากราก)	Oroxylin-A
สารประกอบ 6 (สารสกัดจากราก)	Phthallate
สารประกอบ 7 (สารสกัดจากราก)	Lapachol
สารประกอบ 8 (สารสกัดจากราก)	β-sitosterol

จากตารางที่ 2-1 แสดงเห็นว่าจากสารสกัดจากเปลือกต้นเพกาในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนให้สาร 4 ชนิด คือ Dehydro-iso-β-lapachone, Baicalein, Chrysin และ Lapachol ในส่วนสกัดจากรากให้สาร 4 ชนิด Oroxylin-A, Phthallate, Lapachol และ β-sitosterol ซึ่งพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

ตารางที่ 2-2 ผลการยับยั้งเอนไซม์ lipoxygenase

สารประกอบ/ ส่วนสกัด	% Inhibition	IC_{50}
เปลือกของต้นเพกา	31.0	18.9
ราก	15.5	42.2
Chrysin (สารสกัดจากเปลือก)	41.6	1.73
Lapachol (สารสกัดจากเปลือก)	60.6	0.79
Baicalein (สารสกัดจากเปลือก)	43.3	1.64
Oroxylin-A (สารสกัดจากราก)	40.0	1.87
β -sitosterol (สารสกัดจากราก)	3.9	2.71
Fisetin (Control)	59.5	0.97

จากตารางที่ 2-2 แสดงเห็นว่า ในส่วนสกัดของรากและเปลือกต้นเพกา มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ lipoxygenase โดยสาร Lapachol ที่สกัดได้จากเปลือกต้นเพกาให้ผลยับยั้งเอนไซม์ lipoxygenase สูงสุดร้อยละ 60.6 (IC_{50} = 0.79 μg/mL)

ตารางที่ 2-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของส่วนสกัดหยาบ (100 μg) และสารประกอบที่แยกได้ (5 μg) จากรากและเปลือกต้นเพกา

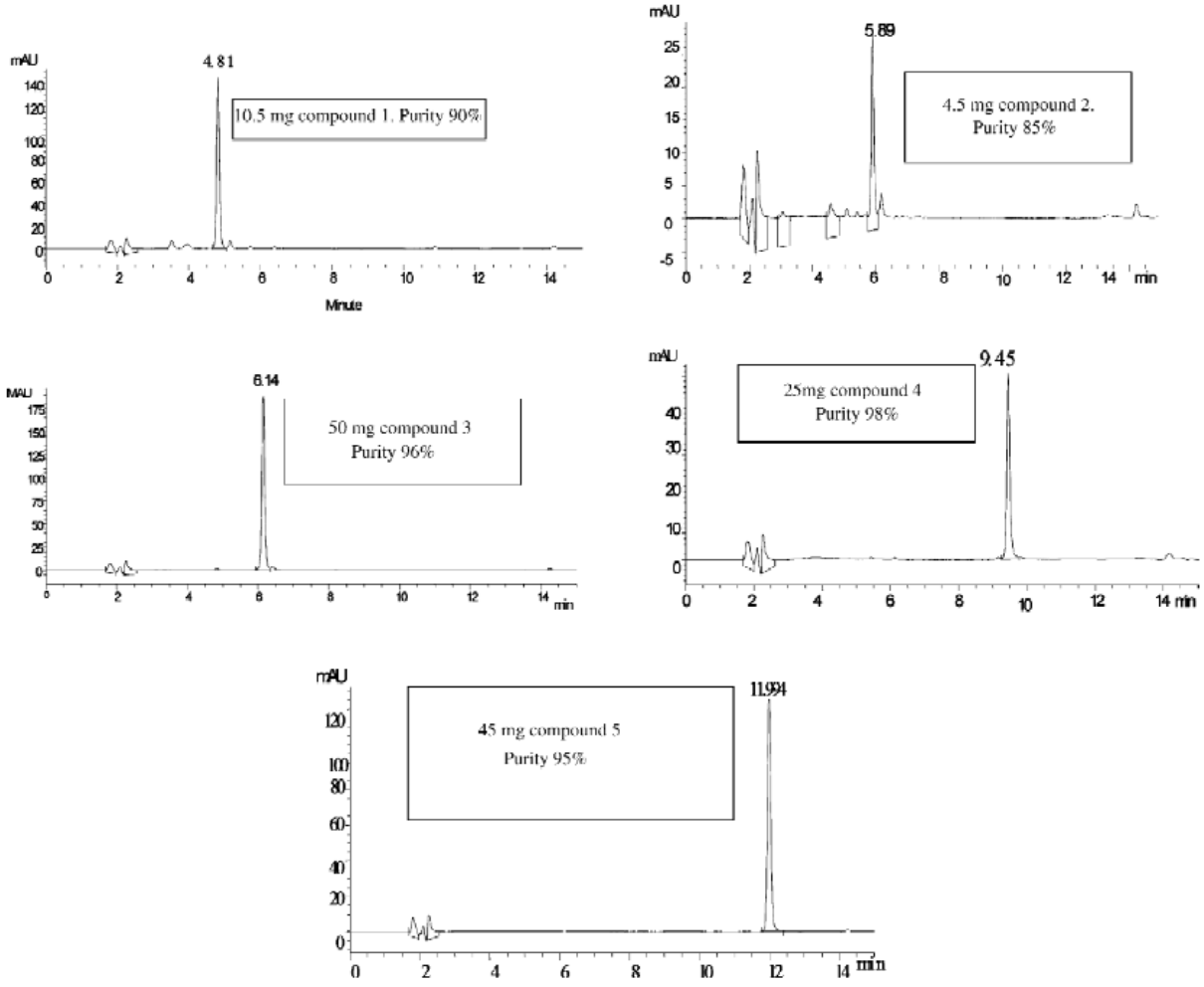
ส่วนสกัด	Inhibition Zone (cm)*				
	B. Subtilis	***S. aureus***	***C. albicans***	***Ps. aeruginosa***	***E. coli***
เปลือกของต้นเพกา	0.07±0.09	0.40±0	0.67±0.01	0.97±0.02	0
ราก	1.93±0.09	1.40±0	0.06±0	0	0
Baicalein	<10	<10	0	0	0
Chrysin	0	0	10-15	10-15	0
Oroxylin-A	10-15	<10	0	0	0
Lapachol	16-20	16-20	0	0	0
β -sitosterol	<10	10-15	0	0	0
Streptomycin (Control)	16-20	10-15	0	10-15	0
Nystatin (Control)	0	0	16-20	0	0

*n = 3

จากตารางที่ 2-2 แสดงเห็นว่า สาร Lapachol มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. Subtilis* และ *S. aureus* เท่ากันกับยาปฏิชีวนะ Streptomycin มีบริเวณยับยั้ง 16-20 เซนติเมตร และสาร Chrysin มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Ps. Aeruginosa* เท่ากันกับยาปฏิชีวนะ Streptomycin ซึ่งมีบริเวณยับยั้ง 10-15 เซนติเมตร

Li-Juan Chen et al. (2002) ศึกษาการแยกและองค์ประกอบของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ของเมล็ดเพกาจากส่วนสกัดชั้น 70% เมทานอลและ2-บิวทานอลโดยใช้เทคนิค high-speed countercurrent chromatography (HSCCC) พบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ 4 ชนิดได้แก่ chrysin, baicalein,

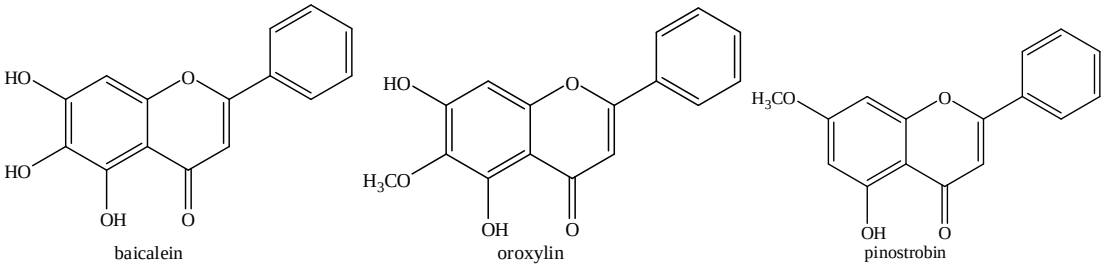
baicalein-7-*O*-glucoside, baicalein-7-*O*-diglucoside (Oroxylin B) และมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ไม่ทราบชื่ออีก 1 ชนิด ทำการวิเคราะห์ระบุโครงสร้างสารโดยใช้เทคนิค HPLC, MS และ NMR ได้ผลการวิเคราะห์ ดังภาพที่ 2-13



ภาพที่ 2-13 ผลการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC ของสารประกอบต่าง ๆ หลังจากแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค HSCCC

จากส่วนสกัดชั้น 70% เมทานอล และ 2-บิวทานอล แยกให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค HSCCC จำนวน 10 ครั้ง ฉีดสารสกัดปริมาณ 20 mg/mL โดยใช้ระบบตัวทำละลาย คลอโรฟอร์ม: เมทานอล: น้ำ (8:10:5, v/v) พบว่าได้สาร baicalein-7-*O*-diglucoside (Oroxylin B) 10.5 mg, chrysin-7-*O*-diglucoside 4.5 mg, baicalein-7-*O*-glucoside 50 mg, baicalein 25 mg และ chrysin 45 mg ซึ่งมีความบริสุทธิ์ 90, 85, 96, 98 และ 95% ตามลำดับ

Luitel et al. (2010) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกต้นเพกาของประเทศเนปาล โดยใช้ส่วนสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตดและเมทานอลมาแยกให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีและโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) วิเคราะห์ระบุโครงสร้างด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี และNMR พบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ใหม่ 3 ชนิด ได้แก่ baicalein, oroxylin และ pinostrobin รวมทั้งสารสเตอรอลที่เคยแยกได้ คือ Stigmast-7-en-3-ol

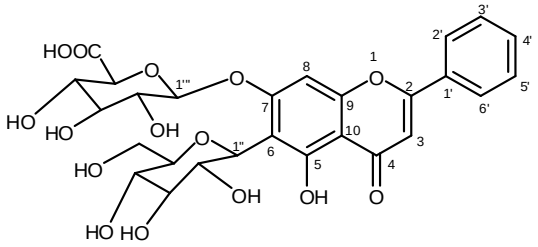


ภาพที่ 2-14 โครงสร้างของสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่แยกได้

นำสารที่ได้ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อไรทะเล พบว่าสาร baicalein และ oroxylin แสดงความเป็นพิษต่อไรทะเล โดยมีค่า LC_{50} 10 µg/mL และ 36 µg/mL ตามลำดับ และทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *B. subtillis*, *S.aurous, E. coli* และ *S. typhi* ด้วยวิธี agar diffusion method มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยมีค่า MIC 4.0 mg/mL และ 8.0 mg/mL ตามลำดับ

Yan et al. (2011) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของฟลาโวนอยด์จากเมล็ดต้นเพกา (*Oroxylum indicum*) สกัดแยกสารด้วย 70% เอทานอล และพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้จากเมล็ดต้นเพกา รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ORAC assay ซึ่งผลการวิจัยพบสารใหม่ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ 3 สาร โครงสร้างของสารใหม่แสดงดังภาพที่ 2-15 เป็นตัวอย่างพิสูจน์โครงสร้างสารใหม่ดังกล่าวด้วยวิธีสเปกโทรสโกปี และพบสารที่ทราบโครงสร้างแล้วอีก 19 สาร แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดโดยวิธี DPPH assay คือสาร baicalein มีค่า IC_{50} เท่ากับ 51.64±0.02 µg/mL และวิธี ORAC assay โดยสาร scutellarein-7-O-β-D-glucopyranosyl (1→6)-β-D-glucopyranoside และ scutellarein-7-O-glucopyranoside แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดที่ความเข้มข้นเท่ากับ 6.77±0.28 และ 7.55 ±1.32 µM Trolox/µM ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้จากการต้านอนุมูลอิสระของทั้งสองวิธีแตกต่างกัน แต่มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันเนื่องจากกลไกต้านอนุมูลอิสระทั้งสองวิธีแตกต่างกันโดยวิธี ORAC assay วิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน สำหรับวิธี DPPH assay วิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว และพบสารหลัก

7 สารที่วิเคราะห์โดยวิธี HPLC ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดเมทานอลของเมล็ดต้นเพกา



ภาพที่ 2-15 โครงสร้างสารใหม่ Chrysin 6-C-β-D-glucopyranosyl-8-O-β-D-glucuronopyranoside

Talari et al. (2012) ศึกษาการหาจำนวนสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในส่วนสกัดตัวทำละลาย เมทานอล คลอโรฟอร์ม เบนซินและปิโตรเลียมอีเทอร์ของใบ ก้านใบ เปลือกของผล เมล็ดและเปลือกของต้นเพกา การหาปริมาณสารฟีนอลิก (TPC) และการหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (TFC) จากส่วนสกัดหยาบโดยใช้วิธีของ Singleton และคณะ การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกใช้ Folin-Ciocalteau รีเอเจนต์ และการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ใช้อลูมิเนียม คลอไรด์ พบว่า ส่วนสกัดชั้นเมทานอลของเมล็ดเพกาให้ปริมาณสารฟีนอลิกสูงสุด 155 mgGAE/100 mg และปริมาณน้อยสุดในส่วนสกัดชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์ของเปลือกต้นเพกาปริมาณ 26 mgGAE/100 mg สำหรับปริมาณฟลาโวนอยด์พบมากสุดในส่วนสกัดชั้นเมทานอลของเปลือกต้นเพกา 207.5 mgCE/100 mg และพบน้อยสุดในส่วนสกัดชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์ของใบเพกาปริมาณ 15 mgCE/100 mg

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1 เครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary evaporator) บริษัท BUCHI, Switzerland

1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง บริษัท Mettler Toledo รุ่น AG203-S, Switzerland

1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง บริษัท Mettler Toledo รุ่น AG245, Switzerland

1.4 เครื่องปั่นน้ำผลไม้ บริษัท Philips รุ่น HR2115 ปริมาตร 2 ลิตร

1.5 อ่างควบคุมอุณหภูมิ บริษัท Grant, England

1.6 เครื่องส่องรังสีเหนือม่วง บริษัท EUROX V70

1.7 หลอดคะปิลลารี

1.8 บีกเกอร์ (Beaker)

1.9 กระบอกตวง (Graduated cylinder)

1.10 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)

1.11 กรวยแก้ว (Glass funnel)

1.12 ขวดก้นกลม (Round bottom flask)

1.13 ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)

1.14 ขวดบรรจุสารขนาดเล็ก (Vial)

1.15 แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)

1.16 หลอดทดลอง (Test tube)

1.17 หลอดหยด (Dropper)

1.18 กระดาษฟอยด์ (Aluminium Foil)

1.19 แผ่น TLC

1.20 กระดาษกรอง Whatman No.1

1.21 แผ่นกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

1.22 ช้อนตักสาร (Spatula)

1.23 ที่ตั้งหลอดทดลองสแตนเลส (Stainless test tube rack)

2. สารเคมี

2.1 น้ำกลั่น (Distilled water)

2.2 Methanol: CH_3OH, AR grade บริษัท J. T. Baker, Germany

2.3 Ethanol: C_2H_5OH, AR grade บริษัท J. T. Baker, Germany

2.4 Hexane: C_6H_{12}, commercial grade บริษัท J. T. Baker, Germany

2.5 Dichloromethane: CH_2Cl_2, commercial grade บริษัท J. T. Baker, USA

2.6 Ethyl acetate: EtOAc, commercial grade บริษัท J. T. Baker, USA

2.7 Acetone: C_3H_6O, AR grade บริษัท J. T. Baker, Germany

2.8 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) บริษัท Fuka, Germany

2.9 Potassium iodide:KI, GR grade บริษัท Merck, Germany

2.10 Iodine: I_2, GR grade บริษัท Merck, Germany

2.11 Bismuth subnitrate, AR grade บริษัท Riedel-De-Haen, Germany

2.12 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) บริษัท Fuka, Germany

2.13 Sulfuric acid: H_2SO_4, AR grade บริษัท

2.14 Sodium hydroxide: NaOH, AR grade บริษัท Carlo erba, France

2.15 Ferric(III)chloride: $FeCl_3$, LR grade บริษัท Ajax Finechem, Australia

2.16 Hydrochloric acid: HCl บริษัท Ajax Finechem, New Zealand

2.17 Ammonia: NH_3 บริษัท Ajax Finechem, New Zealand

2.18 Glacial acetic acid: CH_3COOH บริษัท Ajax Finechem, New Zealand

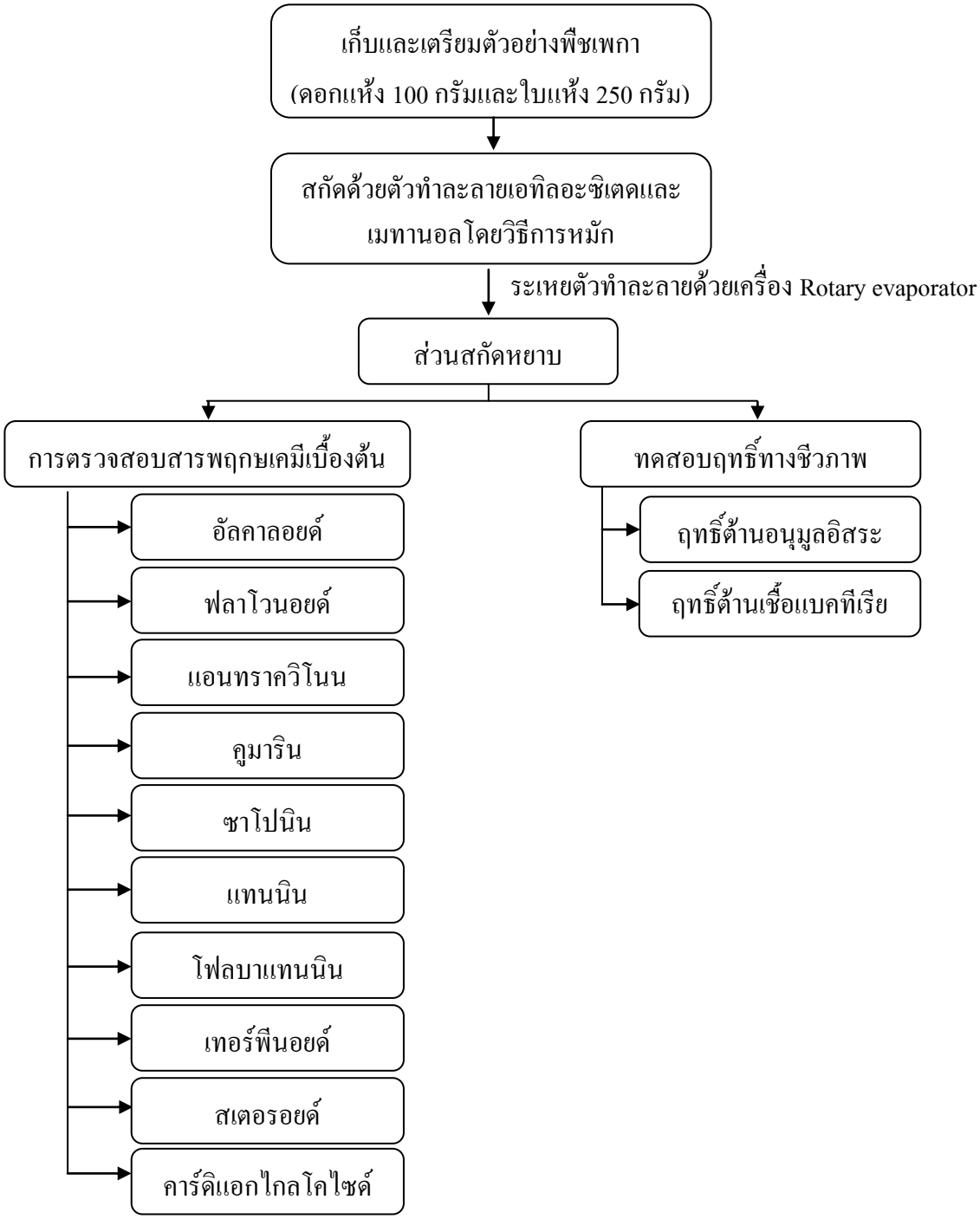
2.19 ลวดแมกนีเซียม (Mg ribbon) บริษัท Ajax Finechem, New Zealand

พืชตัวอย่าง

เพกา (ส่วนดอกและใบ) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Oroxylum indicum*

วิธีการวิจัย

การทดสอบสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเพกา มีขั้นตอนการวิจัยดังภาพที่ 3-1



ภาพที่ 3-1 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างต้นเพกา

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ เพกา (*Oroxylum indicum*) ประกอบด้วย ดอกและใบ เก็บจากสวนสุริยันต์ ตำบลบ้านแป้น อำเภอโพนนาแก้ว จังหวัดสกลนคร ช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2559

2. การเตรียมสารสกัดหยาบของต้นเพกา

นำตัวอย่างเพกาส่วนดอกและใบ ผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น โดยทำการแยกบดแต่ละส่วนของเพกา ดังภาพที่ 3-2 และนำส่วนดอกที่บดละเอียดมาชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง จำนวน 100 กรัม และส่วนใบจำนวน 250 กรัม นำตัวอย่างดอกของเพกามาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตดและเมทานอลอย่างละ 300 มิลลิลิตร และใบเพกาสกัดด้วยตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตด และเมทานอลอย่างละ 1,200 มิลลิลิตร สกัดด้วยวิธีการหมัก (Maceration) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นทำการกรองสารละลายของแต่ละตัวอย่างโดยใช้กรวยแก้วและกระดาษกรองสาร นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (Rotary evaporator) จะได้เป็นส่วนสกัดหยาบ แล้วชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบแต่ละตัวอย่างที่ได้และเก็บตัวอย่างไว้ตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

ภาพที่ 3-2 ส่วนดอกและใบของเพกา (ก) ดอกเพกาแห้ง (ข) ดอกเพกาแห้งบดละเอียด
(ค) ใบเพกาแห้ง (ง) ใบเพกาแห้งบดละเอียด

3. การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening)

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตดและเมทานอลจากเพกา โดยแบ่งการทดสอบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ออกเป็น 10 กลุ่ม ได้แก่ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน โฟลบาแทนนิน เทอร์พีนอยด์ สเตอรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอนดังนี้ (Ayoola et al., 2008)

3.1 การตรวจสอบอัลคาลอยด์ (Alkaloids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 10% H_2SO_4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า นำ ไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (Water bath) 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ไปหยดสารละลายดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏตะกอนสีส้มแดงแสดงว่าพบอัลคาลอยด์

3.2 การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วย 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่ากรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ใส่ลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 1 ชิ้น และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) จำนวน 5 หยด เขย่าแล้วนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

3.3 การตรวจสอบแอนทราควิโนน (Anthaquinones)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 10% H_2SO_4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่านำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรองไปเติมสารละลายแอมโมเนีย (10% NH_3) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีชมพูแดงเกิดขึ้นแสดงว่าพบแอนทราควิโนน

3.4 การตรวจสอบคูมาริน (Coumarin)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วย 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (6M NaOH) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบคูมาริน

3.5 การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins)

ใช้การทดสอบแบบการเกิดฟอง โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที เขย่าอย่างแรง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลองแสดงว่าพบซาโปนิน

3.6 การตรวจสอบแทนนิน (Tannins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน

3.7 การตรวจสอบโฟลบาแทนนิน (Phlobatannins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาทีกรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (10% HCl) จำนวน 5 หยด เขย่า แล้วนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบโฟลบาแทนนิน

3.8 การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบเทอร์พีนอยด์

3.9 การตรวจสอบสเตอรอยด์ (Steroids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมกรดเกลเชียลอะซีติก (Glacial acetic acid) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) จำนวน 3 หยด ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียวแสดงว่าพบสเตอรอยด์

3.10 การตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า เติมกรดเกลเชียลอะซีติก (Glacial acetic acid) จำนวน 5 หยด เขย่า และค่อย ๆ เติม กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทดสอบ DPPH โดยหยดสารสกัดลงบน TLC แล้วนำไปแช่ในระบบตัวทำละลาย เฮกเซน: เอทิลอะซิเตด: เมทานอล (8: 2: 1) จากนั้นทำเครื่องหมายตำแหน่งของสารที่แยกได้บนแผ่น TLC จากนั้นวัดระยะทางที่สารเคลื่อนที่เพื่อ

คำนวณหาค่า R_f แล้วจึงนำไปทดสอบกับสารละลาย DPPH โดยพ่นสารละลายของ DPPH ซึ่งมีสีม่วงลงบนแผ่น TLC ให้ทั่ว ทิ้งไว้ให้แห้ง สังเกตผลจากตำแหน่งการฟอกจาง ถ้าตำแหน่งใดมีการฟอกจางสีของ DPPH จากสีม่วงเป็นสีขาวหรือสีต่างจากเดิม แสดงว่าสารสกัดมีสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (สุชาดา มานอก, 2555)

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในครั้งนี้ใช้วิธี Disc diffusion โดยมีขั้นตอน ดังนี้

การเตรียมหัวเชื้อสำหรับทดสอบ

1. เลี้ยงแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่ใช้ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

2. ใช้ลวดเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีของเชื้อทดสอบประมาณ 5 โคโลนี เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

3. ปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วย 0.85% NaCl ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ซึ่งมีเชื้อประมาณ $1.5x10^8$ CFU ต่อมิลลิลิตร และทำการนับจำนวนเชื้อด้วยวิธีการ Drop plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA)

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น โดยวิธี Disc diffusion

1. ละลายสารสกัดหยาบจากเพกาด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นหยดสารสกัดหยาบจากเพกาลงในดิสก์ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์) และหยด DMSO ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายลงในดิสก์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (Negative control) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที

2. ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อที่เตรียมไว้โดยมีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 จากนั้นป้ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA) ให้ทั่ว (อาหาร MHA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร) โดยป้ายในแนว 3 ระนาบ และใช้ปากคีบปราศจากเชื้อคีบแผ่นดิสก์ที่บรรจุสารสกัดทดสอบจากเพกา (Paper disc) ดิสก์ยา Chloramphenicol ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (Positive control) และดิสก์บรรจุสารละลาย DMSO (Negative control) วางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นอ่านผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในครั้งนี้ใช้วิธี Disc diffusion โดยส่งทดสอบที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเพกา (*Oroxylum indicum*) ในการทดลองในครั้งนี้ ได้แบ่งการทดลองออกเป็น การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทดสอบ DPPH และการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตและเมทานอลจากเพกา ซึ่งมีผลการทดลองเป็น ดังนี้

การสกัดสารสกัดเพกา

จากการนำตัวอย่างเพกา โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ดอกและใบแห้ง มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น โดยทำการแยกบดแต่ละส่วนของเพกา และนำส่วนดอกเพกาที่บดละเอียดมาชั่งจำนวน 100 กรัม มาแยกสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตดปริมาตร 300 มิลลิลิตรและเมทานอลปริมาตร 300 มิลลิลิตร ส่วนใบเพกาบดละเอียดจำนวน 250 กรัม สกัดด้วยทำละลายเอทิลอะซิเตดและเมทานอลอย่างละ 1,200 มิลลิลิตร โดยวิธีการแช่หมัก (Maceration) นำสารละลายที่กรองได้มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดันจะได้ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตด (Ethyl acetate extract) และเมทานอล (Methanol extract) รวม 4 ตัวอย่าง ที่มีน้ำหนักสารสกัดหยาบร้อยละผลผลิต (%Yield) และลักษณะต่าง ๆ ทางกายภาพ ดังแสดงในตารางที่ 4-1 จากตารางพบว่าในตัวทำละลายเมทานอลให้ปริมาณสารสกัดสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายเอทิลอะซิเตดทั้งจากส่วนดอกและใบเพกา โดยสารสกัดหยาบเมทานอลจากดอกเพกามีปริมาณผลที่ได้ (Yield) เท่ากับ 15.0 กรัม คิดเป็นร้อยละ 15.0 ของน้ำหนักแห้ง จากส่วนใบมีปริมาณผลที่ได้ (Yield) เท่ากับ 13.0 กรัม คิดเป็นร้อยละ 5.2 ของน้ำหนักแห้ง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารในตัวอย่างเพกาสามารถละลายในตัวทำละลายเมทานอลที่มีขั้วสูง ซึ่งสามารถละลายสารประกอบต่าง ๆ ที่มีขั้วสูงและขั้วต่ำในตัวอย่างพืชได้ดีกว่าเอทิลอะซิเตดซึ่งมีขั้วต่ำกว่า

ตารางที่ 4-1 ลักษณะทางกายภาพและปริมาณที่สกัดได้ (Yield) ของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตดและเมทานอลของเพกา

ตัวทำละลาย	ส่วนสกัดเพกา	ลักษณะของสารสกัดที่ได้	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละ (%)
เอทิลอะซิเตด	ดอก (FE)	ของเหลวข้นหนืด สีน้ำตาลเข้ม	11.0	11.0
	ใบ (LE)	ของเหลวข้นหนืด สีเขียวดำ	8.0	3.2
เมทานอล	ดอก (FM)	ของเหลวข้นหนืด สีน้ำตาลเข้ม	15.0	15.0
	ใบ (LM)	ของเหลวข้นหนืด สีเขียวดำ	13.0	5.2

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตดและเมทานอลจากเพกา (*Oroxylum indicum*) โดยแบ่งการทดสอบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ออกเป็น 10 กลุ่ม ได้แก่ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน โฟลบาแทนนิน เทอร์พีนอยด์ สเตอรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ อาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 4-2 (รูปภาพแสดงผลการทดลองในภาคผนวก ค) โดยพบสารพฤกษเคมีทั้งหมด 8 กลุ่ม คือ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอยด์ สเตอรอยด์และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ โดยสารกลุ่มอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอยด์ สเตอรอยด์และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์พบในสารสกัดเอทิลอะซิเตดและเมทานอลในส่วนดอกและสารสกัดเมทานอลในส่วนใบ แต่ไม่พบสารกลุ่มสเตอรอยด์ในส่วนดอก ซึ่งผลการทดสอบมีส่วนสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yuan et al. (2008) ที่ทำการศึกษาการแยกสารสำคัญในสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จากใบเพกาโดยใช้ HSCCC ซึ่งพบสาร 7 ชนิด คือ chrysin, baicalein, baicalein-7-O-glucoside, baicalein-7-O-diglucoside, chrysin-7- O-glucuronide, baicalein-7-O-glucuronide และ chrysin-diglucoside และสารสกัดเมทานอลในส่วนใบเพกาสอดคล้องกับผลการวิจัยบางส่วนของ Ramaswamy et al. (2014) ได้ศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของใบและก้านใบเพกาทั้งสดและแห้งสกัดโดยการแช่ด้วยตัวทำละลาย 6 ชนิด พบสารพฤกษเคมีของใบเพกา ในกลุ่มสารอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน สเตอรอยด์ สารประกอบ

ฟีนอล ไขมันและน้ำมัน จากการสกัดด้วยเมทานอลเช่นกัน สำหรับสารสกัดเอทิลอะซิเตดของส่วนใบเพกานั้น พบเพียงสารกลุ่มสเตอรอยด์และคูมารินซึ่งสอดคล้องกับผลจากการสกัดปริมาณผลที่ได้ (Yield) ทั้งส่วนดอกและใบเพกาจะมีปริมาณมากในตัวทำละลายเมทานอล

ตารางที่ 4-2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตดและเมทานอลจากส่วนดอกและใบของเพกา

สารพฤกษเคมี	เพกา			
	ชั้นเอทิลอะซิเตด		ชั้นเมทานอล	
	ดอก	ใบ	ดอก	ใบ
อัลคาลอยด์	+	-	+	+
ฟลาโวนอยด์	+	-	+	+
แอนทราควิโนน	-	-	-	-
คูมาริน	-	+	-	-
ซาโปนิน	+	-	+	+
แทนนิน	+	-	+	+
โพลบาแทนนิน	-	-	-	-
เทอร์พีนอยด์	+	-	+	+
สเตอรอยด์	-	+	-	+
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์	+	-	+	+

หมายเหตุ - หมายถึง ตรวจสอบไม่พบ

\+ หมายถึง ตรวจสอบพบ

จากผลการทดลองดังตารางที่ 4-2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตดและเมทานอลส่วนดอกและใบเพกา พบกลุ่มสารพฤกษเคมีมากที่สุดในสารสกัดเมทานอลของส่วนใบ และไม่พบสารกลุ่มแอนทราควิโนนและโพลบาแทนนินเลยทั้งในสารสกัดเอทิลอะซิเตดและเมทานอลส่วนดอกและใบเพกาซึ่งสอดคล้องกับปริมาณผลได้ (Yield) ที่มีมากในตัวทำละลายเมทานอล

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทดสอบ DPPH โดยผลการสังเกตตำแหน่งการฟอกจางสี DPPH ที่ค่า R_f ต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 4-3 (รูปภาพแสดงผลการทดลองในภาพที่ 4.1) ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบของเพกาทั้งส่วนดอกและใบในตัวทำละลายทุกชนิดให้ผลการต้านอนุมูลอิสระ พบสารมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดในสารสกัดเอทิลอะซิเตดส่วนดอกและใบ โดยที่สารสกัดเอทิลอะซิเตดส่วนใบมีสารมากที่สุดและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากสุด 5 ตำแหน่ง และพบสารเรืองแสงใต้ UV 1 จุด มีค่า R_f เท่ากับ 0.55 โดยจากการทดสอบพฤกษเคมีสารที่แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระมีองค์ประกอบทางเคมีในกลุ่มสาร ฟลาโวนอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แทนนิน เทอร์พีนอยด์ และซาโปนิน

ตารางที่ 4-3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนดอกและใบเพกาที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตดและเมทานอล

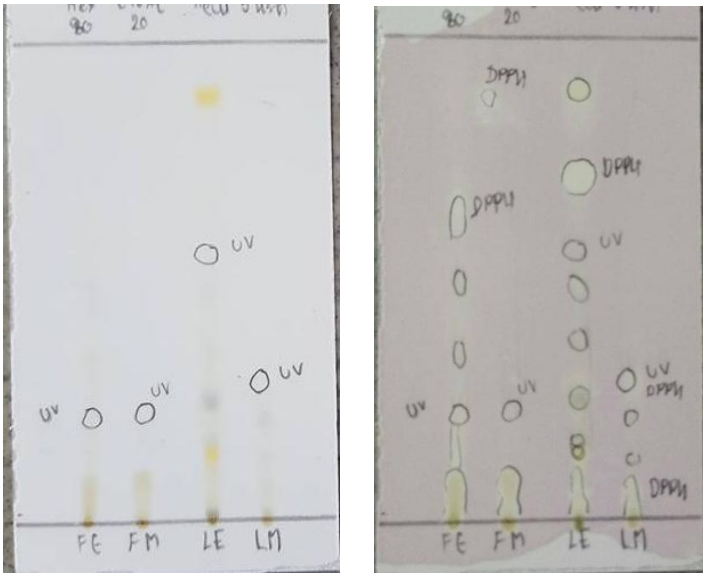
ตัวทำละลาย	ส่วนสกัดเพกา	ค่า R_f ที่พบ	ค่า R_f ที่ฟอกจางสี DPPH
เอทิลอะซิเตด	ดอก (FE)	0.09, 0.22*, 0.34, 0.48, 0.62	0.09, 0.34, 0.48, 0.62
	ใบ (LE)	0.09, 0.14, 0.16, 0.33, 0.38, 0.47, 0.55*, 0.70, 0.90	0.09, 0.38, 0.47, 0.70, 0.90
เมทานอล	ดอก (FM)	0.09, 0.22*, 0.87	0.09, 0.87
	ใบ (LM)	0.08, 0.13, 0.20, 0.28*	0.08, 0.28*

หมายเหตุ เฟสเคลื่อนที่ คือ เฮกเซน: เอทิลอะซิเตด: เมทานอล ในอัตราส่วน 8: 2: 1

* หมายถึง ตำแหน่งที่เรืองแสงใต้ UV

จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตดและเมทานอลจากส่วนดอกและใบเพกาทั้ง 4 ตัวอย่าง มีการฟอกจางสีของสารละลาย DPPH ได้ แสดงว่าสารสกัดหยาบส่วนดอกและใบเพกานี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Yuan et al. (2008) ในการแยกสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จากส่วนของใบเพกาโดย HSCCC ซึ่งพบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ 7 ชนิด ในส่วนสกัดชั้นเมทานอล ได้แก่ chrysin, baicalein, baicalein-7-O-glucoside, baicalein-7-O-diglucoside, chrysin-7-O-glucuronide,

baicalein-7-O-glucuronide และ chrysin-diglucoside โดยสารกลุ่มนี้เป็นสารประกอบฟีนอลิก มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และมีความสอดคล้องกับผลการวิจัยบางส่วนของ วิชุดา กล้าเวช และคณะ (2554) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และยับยั้งเอนไซม์แอฟากลูโคซิเดส จากสารสกัดทั้งสดและแห้งของผักพื้นบ้าน 9 ชนิด พบว่า สารสกัดจากฝักเพกาแห้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด

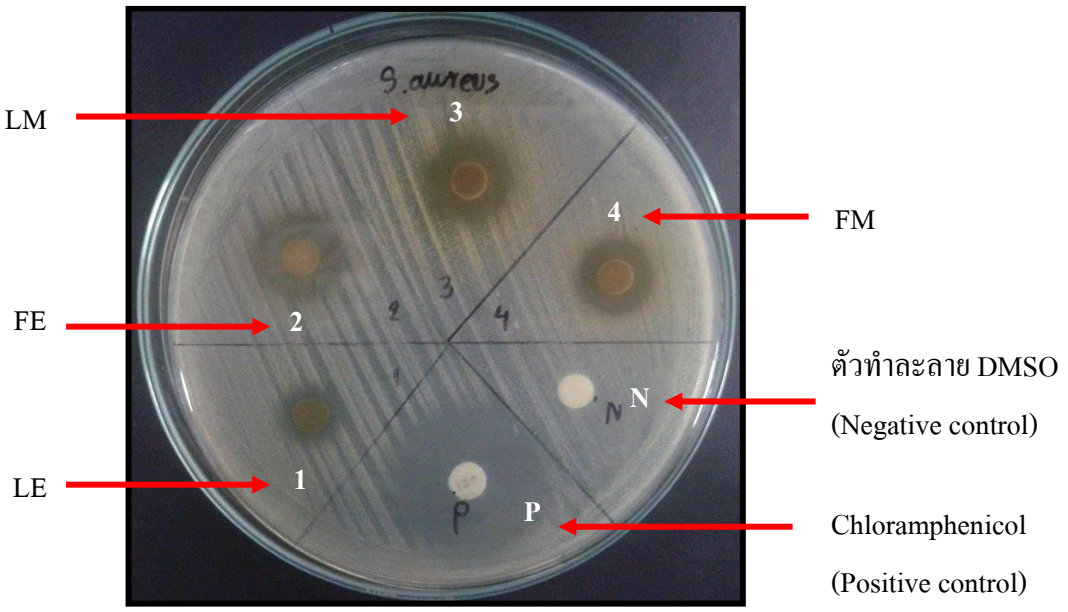


(ก) (ข)

ภาพที่ 4-1 แผ่นโครมาโทกราฟแบบบาง (TLC) ที่ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
(ก) ยังไม่ฉีดพ่นด้วยสารละลาย DPPH (ข) ฉีดพ่นด้วยสารละลาย DPPH

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

เมื่อนำสารสกัดหยาบเพกาในแต่ละตัวทำละลายมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบนั้นเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* เทียบกับยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol และ DMSO โดยวิธี Agar Disc Diffusion ดังตัวอย่างภาพที่ 4-2



ภาพที่ 4-2 ภาพแสดงตัวอย่างการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ของสารสกัดหยาบเพกา ชั้นเอทิลอะซิเตดส่วนดอก (FE) และใบ (LE) ชั้นเมทานอลส่วนดอก (FM) และใบ (LM)

จากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของเพกา จำนวน 4 ตัวอย่างโดยมีความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ให้ผลดังตารางที่ 4-4 (รูปภาพแสดงผลการทดลองในภาคผนวก ง) พบว่าสารสกัดหยาบเพกาชั้นเอทิลอะซิเตดส่วนดอก (FE) และใบ (LE) ชั้นเมทานอลส่วนดอก (FM) และใบ (LM) จำนวน 4 ตัวอย่าง สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus* และ *B. subtilis* เมื่อเปรียบเทียบขนาด inhibition zone พบว่า สาร FE มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สูงที่สุด ให้ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งของเชื้อแบคทีเรีย 13.83 ± 2.88 สำหรับแบคทีเรีย *S. aureus* สาร LM มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียสูงที่สุด 13.33 ± 0.70 ดังภาพที่ 4-2 ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ คือ *P. aeruginosa* พบว่าสาร FE และ FM สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ให้ค่า Inhibition zone เท่ากับ 11.00 ± 0.50 และ 7.50 ± 0.50 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบขนาด inhibition zone พบว่า สาร FE มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียมากกว่า ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการวิจัยบางส่วนของ Rasadah et al. (1998) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยใช้วิธี Disc Diffusion และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดและองค์ประกอบทางเคมีของรากและเปลือกต้นเพกา พบว่าส่วนสกัดชั้นไดคลอมีเทนแยกสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และกลุ่มแนฟโทควิโนน โดยให้ผลการยับยั้งเชื้อ *B.subtilis*, *S. aureus* และ *P. aeruginosa* โดยผลการทดสอบสารพฤษเคมีของสารสกัดเอทิลอะซิเตดและเมททานอลส่วนดอกและใบเพกาพบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เช่นกัน นอกจากนี้พบว่ามีเพียงสาร FE เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ ให้ค่า Inhibition zone เท่ากับ 8.50 ± 0.80

ตารางที่ 4-4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเพกา

แบคทีเรียทดสอบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (มิลลิเมตร) ± SD*					
	LE	LM	FE	FM	Chloramphenicol (30 µL/disc)	DMSO
B. subtilis	7.66 ± 0.70	9.16 ± 1.10	13.83 ± 2.88	9.16 ± 1.40	26.00 ± 0.80	-
S. aureus	8.33 ± 0.70	13.33 ± 0.70	12.83 ± 1.10	12.00 ± 0.50	26.83 ± 1.60	-
E. coli	-	-	8.50 ± 0.80	-	27.16 ± 0.76	-
P. aeruginosa	-	-	11.00 ± 0.50	7.50 ± 0.50	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มี inhibition zone

* หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

จากตารางการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar Disc Diffusion พบว่าสารสกัดหยาบเพกาในทุก ๆ ตัวอย่างมีปริมาณ 20 ไมโครลิตรต่อแผ่น (20 µL/disc) ซึ่งสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตดส่วนดอก มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ทุกชนิดเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบอื่น และมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *P. aeruginosa* สูงสุด ให้ค่า Inhibition zone เท่ากับ 13.83 ± 2.88 และ11.00 ± 0.50 ตามลำดับ

สำหรับ Chloramphenicol ไม่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้ อาจเกิดจากตัวทำละลายที่ใช้ทำให้คุณสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของยาปฏิชีวนะเปลี่ยนแปลงไป ฤทธิ์ในการยับยั้งแตกต่างกันมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับสารที่ใช้ในการแช่ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของกฤติกา นรจิตร (2548)

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

ผลการสกัดส่วนดอกและใบเพกา โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เอทิลอะซิเตตและเมทานอล เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นโดยวิธีการทดสอบการเกิดสีและตะกอน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการฟอกจางสี DPPH และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี Agar Disc Diffusion ในสารสกัดหยาบ สามารถสรุปผล ดังนี้

1. ปริมาณสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตจากดอกและใบเพกา คิดเป็นร้อยละ 11.0 และ 3.2 ตามลำดับ และสารสกัดหยาบเมทานอลจากดอกและใบเพกา คิดเป็นร้อยละ 15.0 และ 5.2 ตามลำดับ โดยลักษณะสารสกัดหยาบที่สกัดจากส่วนดอกมีลักษณะเป็นของเหลวข้นหนืดสีน้ำตาลเข้มและสารสกัดหยาบที่สกัดจากส่วนใบมีลักษณะเป็นของเหลวข้นหนืดสีเขียวดำ ซึ่งจากปริมาณสารที่สกัดได้ พบว่าสารสกัดจากส่วนดอกให้ปริมาณสารสกัดหยาบสูงกว่าจากส่วนใบ และสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลให้ปริมาณสารสกัดหยาบมากกว่าเอทิลอะซิเตต แสดงว่าสารสกัดหยาบมีปริมาณมากขึ้นตามสภาพขั้วที่สูงขึ้นของตัวทำละลาย

2. ผลการศึกษาสารพฤกษเคมีโดยการทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสีและการตกตะกอนพบว่าสารสกัดหยาบทั้งจากส่วนดอกและใบเพกาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตและเมทานอล มีสารพฤกษเคมี 8 กลุ่ม คือ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอยด์ สเตอรอยด์และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ โดยสารกลุ่มอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอยด์ สเตอรอยด์และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์พบในสารสกัดเอทิลอะซิเตดและเมทานอลในส่วนดอกและสารสกัดเมทานอลในส่วนใบ แสดงว่าสารสกัดทั้งสองส่วนมีสารพฤกษเคมีเบื้องต้นที่ไม่แตกต่างกัน แต่ไม่พบสารกลุ่มสเตอรอยด์ในส่วนดอก ในขณะที่สารสกัดเอทิลอะซิเตดของส่วนใบเพกานั้น พบเพียงสารกลุ่มสเตอรอยด์และคูมาริน

3. ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการฟอกจางสี DPPH ในระบบตัวทำละลายเฮกเซน: เอทิลอะซิเตด: เมทานอล (8: 2: 1) พบว่า สารสกัดหยาบของเพกาทั้งส่วนดอกและใบในตัวทำละลายทุกชนิดให้ผลการต้านอนุมูลอิสระ และพบสารมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดในสารสกัดเอทิลอะซิเตดส่วนดอกและใบ โดยที่สารสกัดเอทิลอะซิเตดส่วนใบมีสารมากที่สุดและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากสุด 5 ตำแหน่ง จุด มีค่า R_f เท่ากับ 0.09, 0.38, 0.47, 0.70 และ 0.90 ตามลำดับ

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar Disc Diffusion พบว่าสารสกัดหยาบทุกตัวมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *B.subtilis* และ *S.aureus* เทียบกับยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol และ DMSO โดยสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตจากส่วนดอกให้ผลยับยั้งการเจริญของ *B.subtilis* และ *P. aeruginosa* ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบอื่น ให้ค่า Inhibition zone เท่ากับ 13.83 ± 2.88 และ 11.00 ± 0.50 ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตดส่วนดอก มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ทุกชนิดเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบอื่น

จากผลการทดสอบสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดเพกาแสดงให้เห็นว่าสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตส่วนดอกเพกา ตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นได้แก่ กลุ่มอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอยด์ สเตอรอยด์และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ และยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคในอาหารดีที่สุด แสดงให้เห็นว่าหากทำการศึกษาอย่างละเอียดมากขึ้น เพกานับเป็นพืชทางเลือกหนึ่งที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีและมีกลุ่มสารพฤกษเคมีที่น่าสนใจสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ

ข้อเสนอแนะ

ในการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบ ทำให้ทราบข้อมูลเบื้องต้นที่เป็นประโยชน์ ในการวิจัยต่อไปควรศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ เช่นความเป็นพิษต่อเซลล์จากตับ เซลล์จากไต รวมทั้งเซลล์มะเร็ง เพื่อเป็นข้อมูลที่สนับสนุนการพัฒนาสมุนไพรมาใช้แทนยาแผนปัจจุบันในการรักษาโรคต่อไปและการหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเพกาส่วนดอก

บรรณานุกรม

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

คณะกรรมการกลุ่มผลิตชุดวิชาเภสัชพฤกษศาสตร์. (2547). *เภสัชพฤกษศาสตร์*. นนทบุรี: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช.

คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีการอาหาร. (2539). *วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร*. กรุงเทพฯ: คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์, 1*(1), 59-70.

ดา ดา. (2548). *ดอกไม้ใส่ชื่อตอน 93*. เข้าถึงได้จาก http://topicstock.pantip.com/jatujak/topicstock/J3707918/J3707918-4.jpg

นันทวัน บุณยะประภัศร. (2544). การสกัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสำคัญจากสมุนไพร. ใน นพมาศ สุมทรเจริญนนท์ (บรรณาธิการ), เภสัชวินิจฉัย *ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่มที่ 1*. (หน้า 129-162). กรุงเทพฯ: แสงเทียนการพิมพ์.

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

ระวิวรรณ แก้วอมตวงค์ และทรงพร จึงมั่นคง. (2549). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารฟีนอลรวมของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยบางชนิด. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*, *8*(2), 76-88.

วาริชัย พิมพ์บุตร, มาระตรี เปลี่ยนศิริชัย, วรัญ แก้วดวงตา, สมศักดิ์ นวลแก้ว และสุจริต ส่วนไพโรจน์. (2554). สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในใบอ่อนของเพี้ยฟาน เพกา และขี้เหล็กหวาน. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, *42*(1), 330-332.

วันดี กฤษณพันธ์. (2544). พฤกษเคมีเบื้องต้น. ในนพมาศ สุมทรเจริญนนท์ (บรรณาธิการ), *เภสัชวินิจฉัย ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่มที่ 1* (หน้า 34-102). กรุงเทพฯ: แสงเทียนการพิมพ์.

วิชุดา กล้าเวช, ฮายาตี เจ๊ะตาเห, ศิญาพร เจ้ยทองศรี และปวีณา ดิกิจ. (2554).ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสจากสารสกัดผักพื้นบ้านในจังหวัดพัทลุง. *วารสารวิชาการและวิจัย มทร.พระนคร ฉบับพิเศษ*, *5*, 331-336.

สุชาดา มานอก. (2555). การตรวจสอบสมบัติของการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร. *วารสารก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์*, *12*(2), 34-46.

สุดารัตน์ หอมหวน. (2553). *ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*. เข้าถึงได้จาก http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=84

สุวิมล กีรติพิบลู. (2546). *จุลินทรีย์กับการควบคมสุขลักษณะการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร*. กรุงเทพฯ: สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น).

สำนักงานข้อมูลสมุนไพร. (ม.ป.ป.). *เพกา*. เข้าถึงได้จาก http://medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/oroxylum.html

อุดมการณ์ อินทุใส และปาริชาติ ทะนานแก้ว. (2549). *สมุนไพรไทยตำรับยาบำบัดโรคบำรุงร่างกาย* กรุงเทพฯ: มติชน.

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

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

Ayoola, G. A., Coker, H. A. B., Adesegun, S. A., Adepoju-Bello, A. A., Obaweya, K., Ezennia, E.C., & Atangbayila, T. O. (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *7*(3), 1019-1024.

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

Chen, L. J., Games, E. D., & Jones, J. (2003). Isolation and identiflcation of four flavonoid constituents from the seeds of *Oroxylum indicum* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A, 988*, 95-105.

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

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

Kaewamatawong, R., & Jounmunkong, Z. (2006). DPPH free radical scavenging activity and total phenol compounds content of some thai medicinal plant extracts . *Journal of Ubon Ratchathani university*, *2*(8), 76-88.

Khandhar, M., Shah, M., Santani, D., & Jain, S. (2006). Antiulcer activity of the root bark of *Oroxylum indicum* against experimental gastric ulcers. *Pharmaceutical Biology(Philadelphia, PA, United States), 44*(5), 363-370.

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.

Luitel, H., N., Rajbhandari, M., Kalauni, S., K., Awale, S., Masuda, K., & Gewali, M. B. (2010). Chemical constituents from *Oroxylum indicum* (L.) Kurz of Nepalese orign. *Scientific World*, *8*(8), 66-68.

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

Nakahara, K., Onishi-Kameyama, M., Ono, H., Yoshida, M., & Trakoontivakorn, G. (2001). Antimutagenic activity against Trp-P-1 of the edible Thai plant, *Oroxylum indicum* Vent. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 65*(10), 2358-2360.

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.

Ramaswamy, N., Samatha, T., Srinivas, P., & Chary, R. S. (2014). Phytochemical screening and TLC studies of leaves and petioles of *Oroxylum indicum* (L.) Kurz an endangered ethno medicinal tree. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences, 4*(1), 2306-2313.

Rasadah, M. A., Houghton, P. J., & Hoult, J. R. S. (1998). Antimicrobial and antiinflammatory activities of extracts and constituents of *Oroxylum indicum* (L.) Vent. *Phytomedicine*, *5*(5), 375-381.

Roy, M. K., Nakahara, K., Thalang, V. N., Trakoontivakorn, G., Takenaka, M., Isobe, S., Tsushida, T. (2007). Baicalein, a flavonoid extracted from a methanolic extract of *Oroxylum indicum* inhibits proliferation of a cancer cell line in vitro via induction of apoptosis. *Pharmazie*, *62*(2), 149-153.

Samatha, T., Shyamsundrachary, R., Srinivas, P., & Swamy, N. R. (2012). Quantification of total phenolic and total flavonoid contents in extracts of *Oroxylum indicum L.*Kurz. *Asian journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *5*(4), 177-179.

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

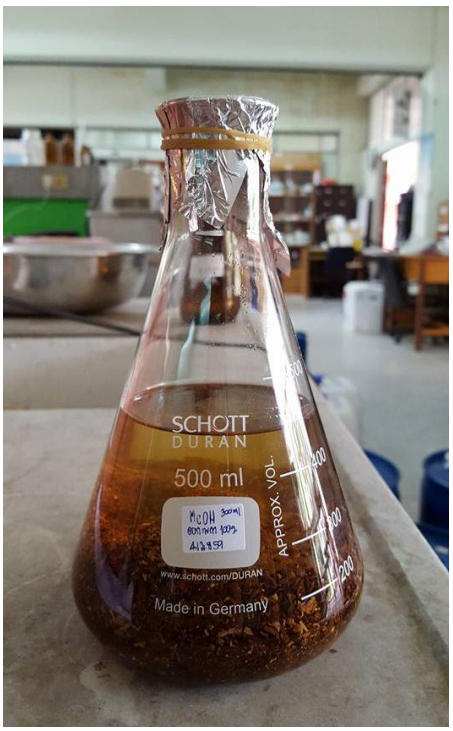
Yan, R., Cao, Y., Chen, C., Dai, H., Yu, S., Wei, J., Li, H., & Yang, B. (2011). Antioxidant flavonoids from the seed of *Oroxylum indicum*. *Fitoterapia*, *82*, 841-848.

Yuan, Y., Wenli, H., Minhai, Tang., Houding, L., Li-Juan, C. Y., Hugh, G., & Ian, A. S. (2008). Separation of flavonoids from the leaves of *Oroxylum indicum* by HSCCC. *Chromatographia*, *68*, 885-892.

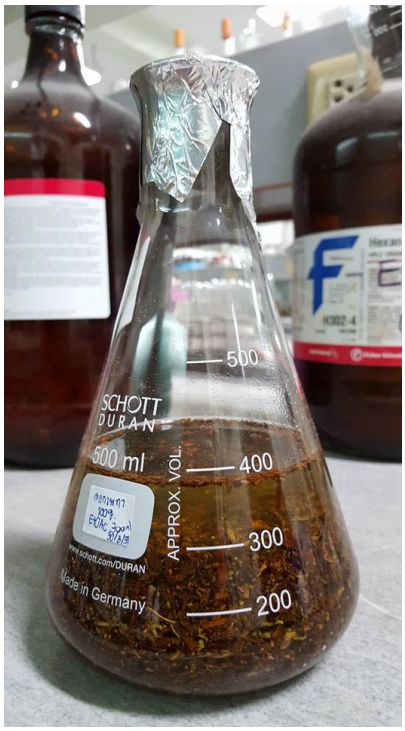
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

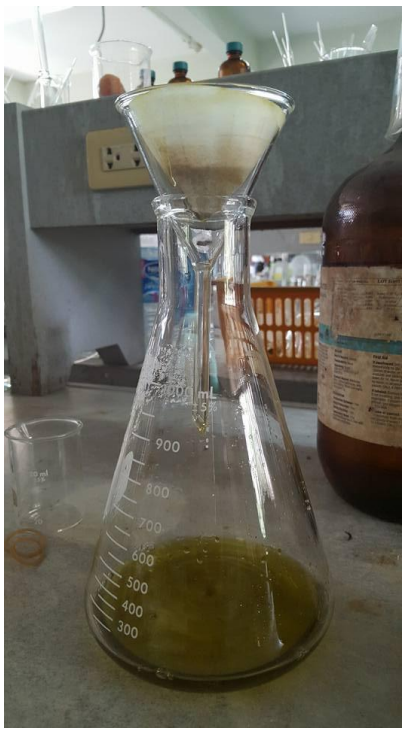
การสกัดสารสกัดเพกา



ภาพภาคผนวก ก-1 การสกัดเพกาส่วนดอกแห้งที่บดละเอียดด้วยทำละลายเมทานอล



ภาพภาคผนวก ก-2 การสกัดเพกาส่วนดอกแห้งที่บดละเอียดด้วยทำละลายเอทิลอะซิเตด

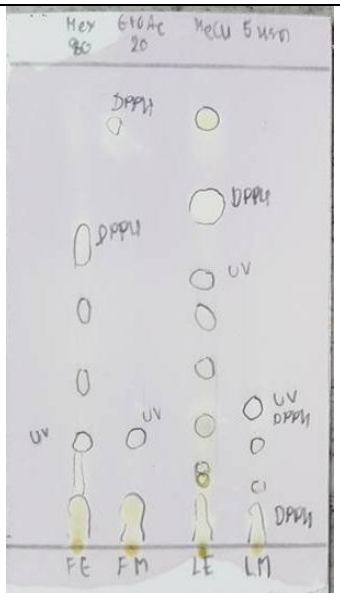
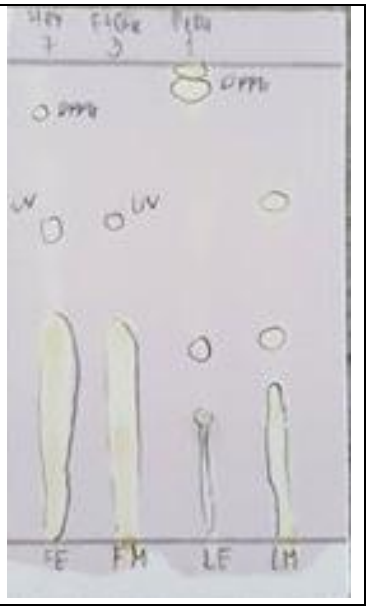


ภาพภาคผนวก ก-3 กรองสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ภาพภาคผนวก ก-4 การระเหยด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (Rotary evaporator)

ภาคผนวก ข

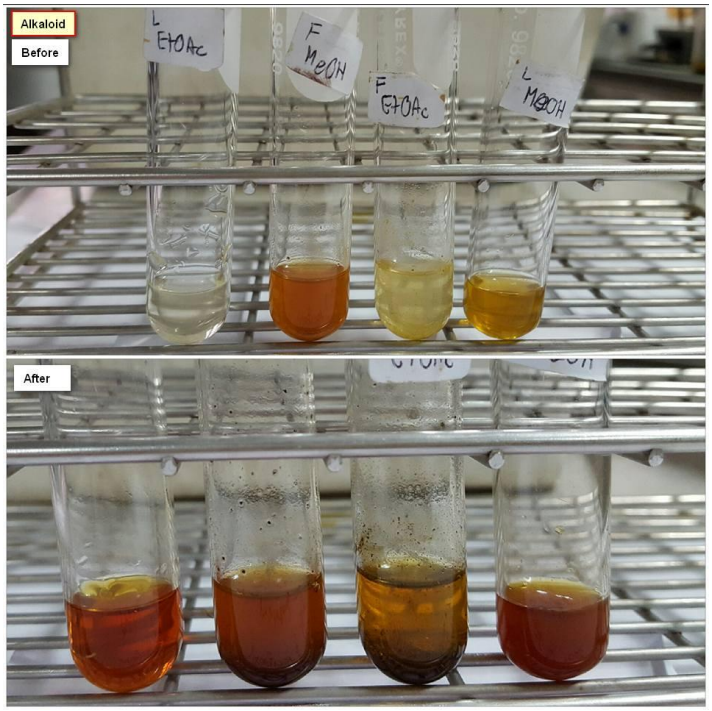
ภาพการหาระบบสาร TLC และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธีการทดสอบ DPPH

		
EtOAc: Hexane: MeOH 2: 8: 1	EtOAc: Hexane 3: 7	EtOAc: Hexane: MeOH 3: 7: 1

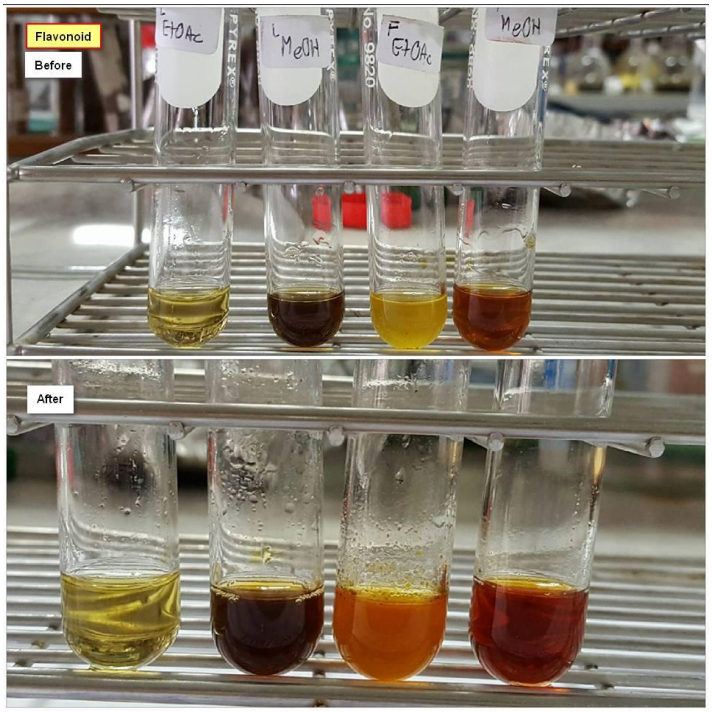
ภาพภาคผนวก ข-1 การทดสอบ TLC หาระบบแยกสารสกัดเพกาด้วยวิธีการแช่ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตด และเมทานอลและการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี TLC

ภาคผนวก ค

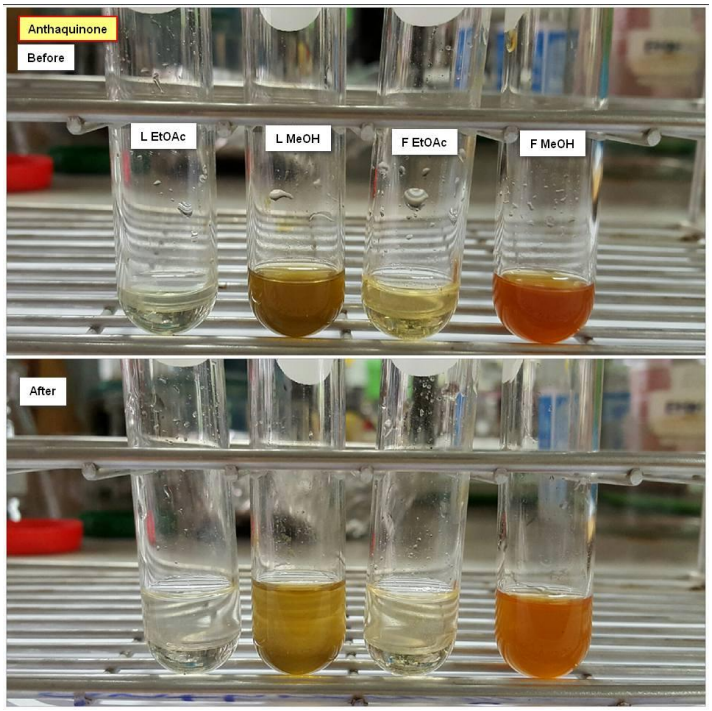
การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น



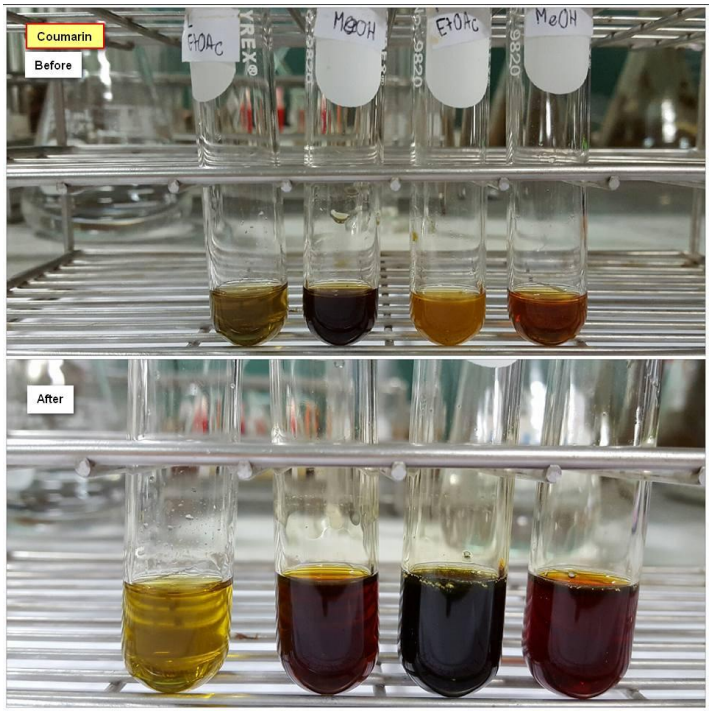
ภาพภาคผนวก ค-1 การตรวจสอบอัลคาลอยด์ (Alkaloids)



ภาพภาคผนวก ค-2 การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

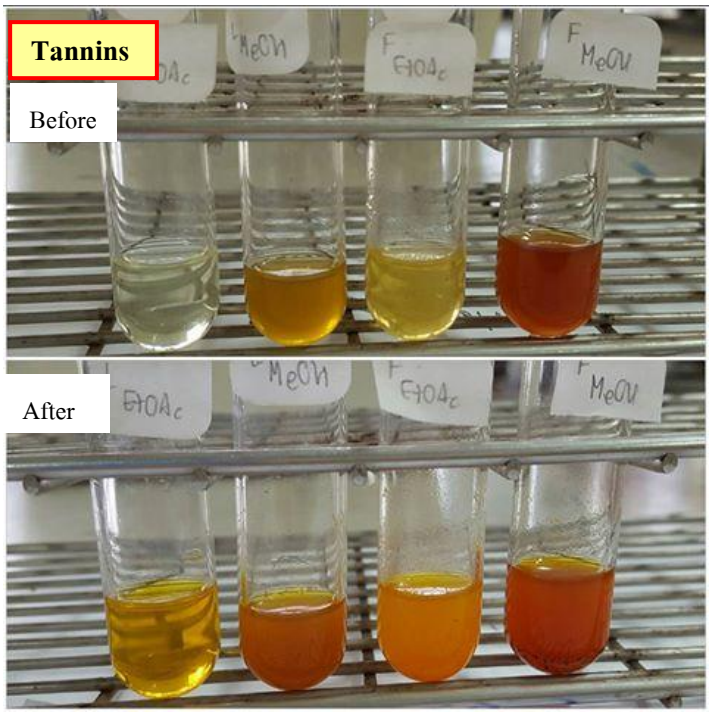


ภาพภาคผนวก ค-3 การตรวจสอบแอนทราควิโนน (Anthaquinones)

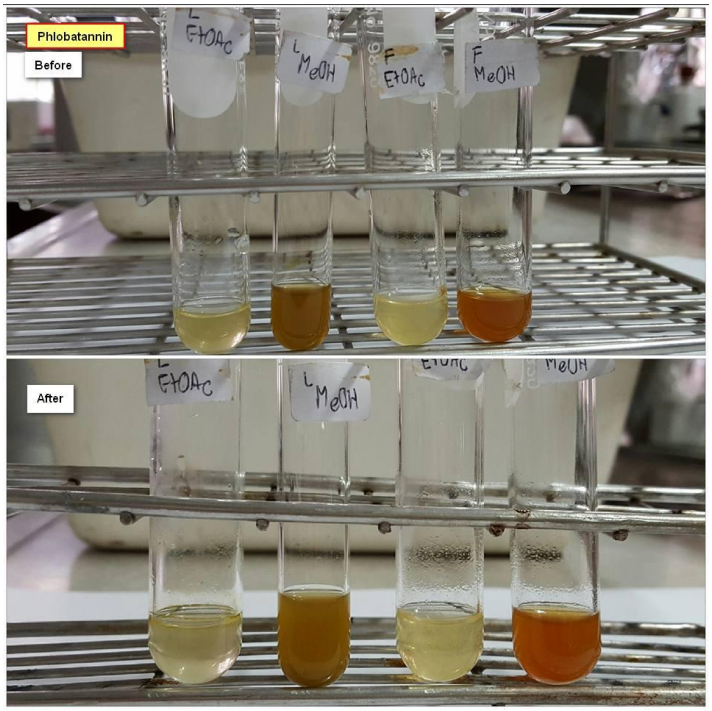


ภาพภาคผนวก ค-4 การตรวจสอบคูมาริน (Coumarin)

ภาพภาคผนวก ค-5 การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins)

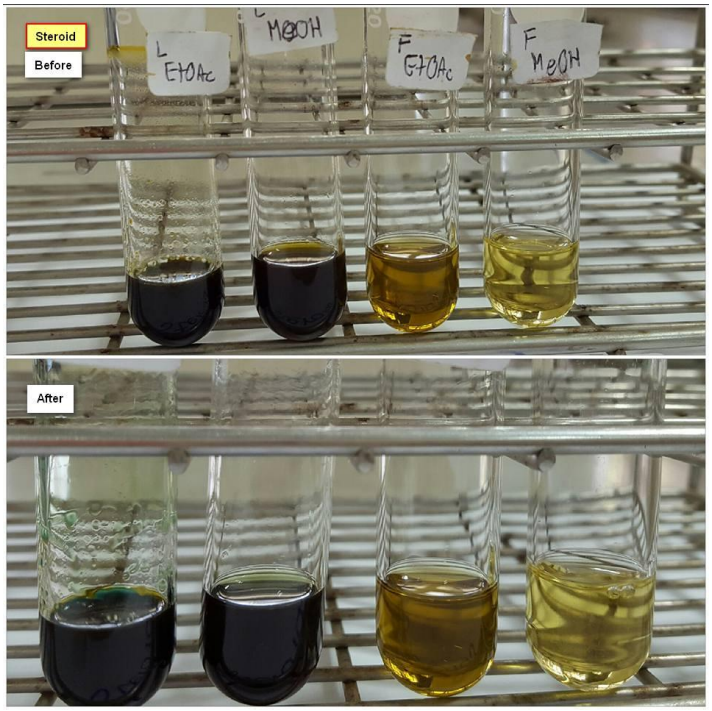


ภาพภาคผนวก ค-6 การตรวจสอบแทนนิน (Tannins)

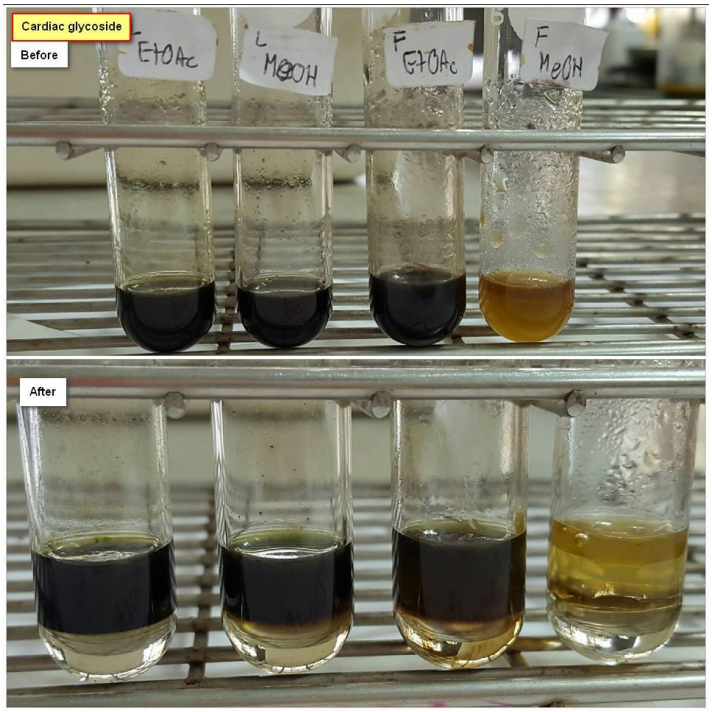


ภาพภาคผนวก ค-7 การตรวจสอบโฟลบาแทนนิน (Phlobatannins)

ภาพภาคผนวก ค-8 การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids)



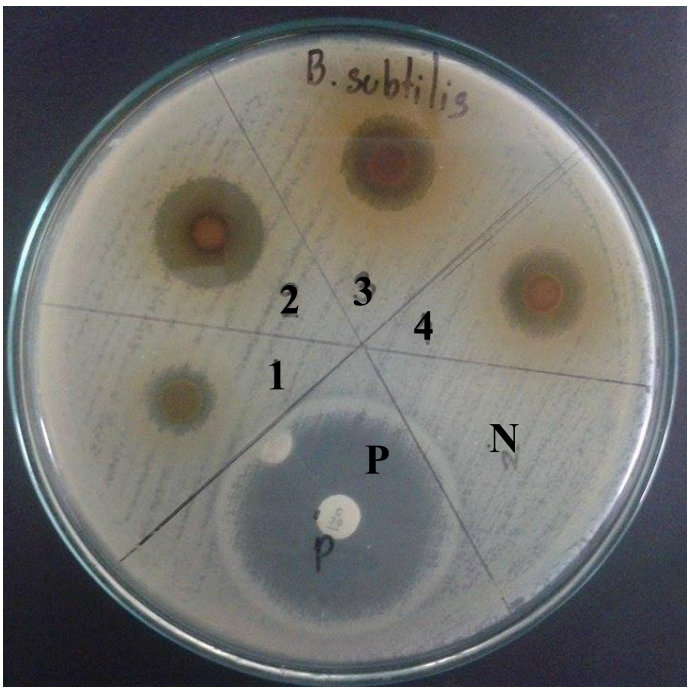
ภาพภาคผนวก ค-9 การตรวจสอบสเตอรอยด์ (Steroids)



ภาพภาคผนวก ค-10 การตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides)

ภาคผนวก ง

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย



ภาพภาคผนวก ง-1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion ของสาร FE LE FM และ LM ในการต้านการเจริญของ *Bacillus subtilis*

1 : LE (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

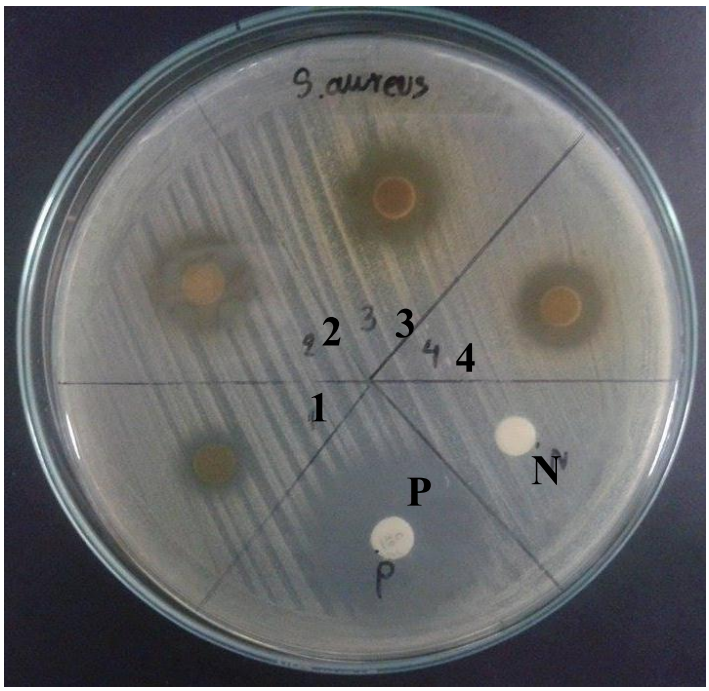
2 : FE (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : LM (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

4 : FM (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

P : ดิสก์ยา Chloramphenicol 30 ไมโครกรัม/ดิสก์ (positive control)

N : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



ภาพภาคผนวก ง-2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion ของสาร FE LE FM และ LM ในการต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus*

1 : LE (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

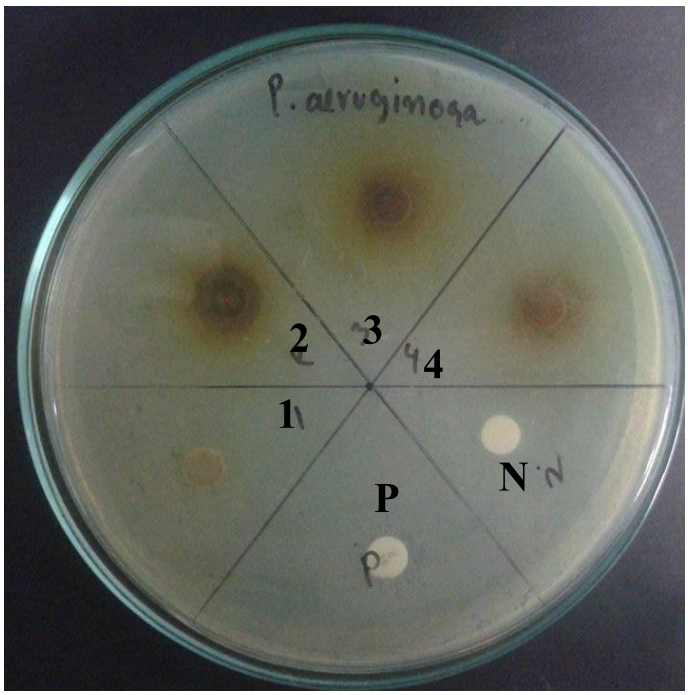
2 : FE (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : LM (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

4 : FM (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

P : ดิสก์ยา Chloramphenicol 30 ไมโครกรัม/ดิสก์ (positive control)

N : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



ภาพภาคผนวก ง-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion ของสาร FE LE FM และ LM ในการต้านการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa*

1 : LE (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

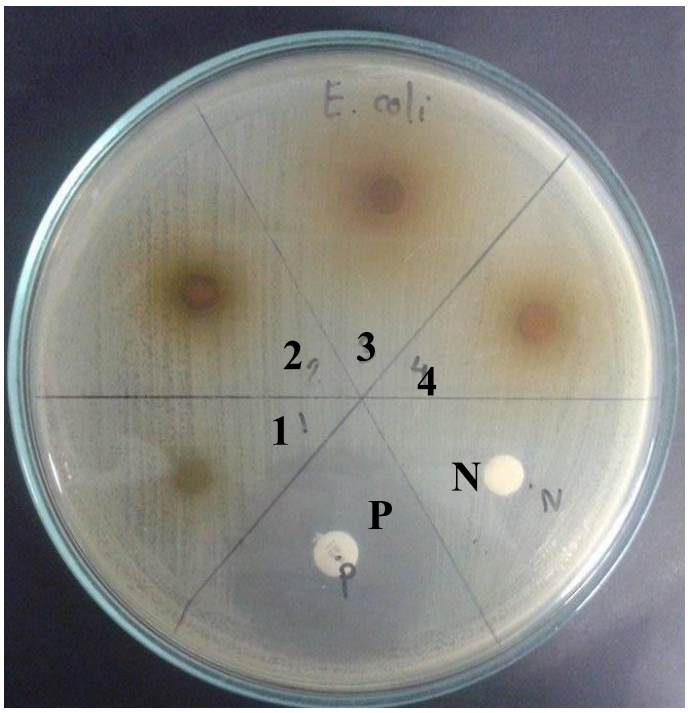
2 : FE (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : LM (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

4 : FM (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

P : ดิสก์ยา Chloramphenicol 30 ไมโครกรัม/ดิสก์ (positive control)

N : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)



ภาพภาคผนวก ง-4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion ของสาร FE LE FM และ LM ในการต้านการเจริญของ *Escherichia coli*

1 : LE (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

2 : FE (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

3 : LM (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

4 : FM (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์)

P : ดิสก์ยา Chloramphenicol 30 ไมโครกรัม/ดิสก์ (positive control)

N : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)