ผลของสารสกัดไพลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

Effect of the Extracts from *Zingiber montanum* on Antimicrobial Activity

โดย

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล

RCH
QK
A95
Z65
2164 ค

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน 64351

วัน,เดือน,ปี 1 1 0 ย. 2549

.b 11647125

.i.....

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

งบรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำงบประมาณ 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการวิจัย ผลของสารสกัดไพลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
ผู้วิจัย รศ.ดวงใจ โอชัยกุล
ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง

บทคัดย่อ

สกัดเหง้าไพล (*Zingiber montanum*) โดยวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ลำดับ เฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเมทานอล ได้สารสกัดหยาบร้อยละ 2.89 1.87 และ 6.21 ต่อน้ำหนักแห้งตามลำดับ จากนั้นเจือจางสารสกัดหยาบด้วย tween 80 ร้อยละ 5 แล้วทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ 12 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Agar Diffusion ผลปรากฏว่าสารสกัดหยาบไพลในชั้นตัวทำละลายเฮกเซนมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ดี มีบริเวณยับยั้งระหว่าง 7.87-19.27 มิลลิเมตร แต่ยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ได้น้อย สารสกัดหยาบไพลในชั้นเอทิล อะซิเตทและเมทานอลยับยั้งแบคทีเรียได้ดี เมื่อแยกสารสกัดหยาบไพลในชั้นเฮกเซนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีได้สาร 7 ส่วน (H1-H7) ซึ่งในสารสกัดส่วนที่ 1 (H1) กับส่วนที่ 7 (H7) ให้ผลการยับยั้งได้ดีกว่าสารสกัดส่วนอื่น H1 มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีในทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ H7 มีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีในแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อแยกสารสกัดหยาบไพลในชั้นเอทิล อะซิเตทด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีได้สาร 7 ส่วน (E1-E7) แต่สารสกัดทั้ง 7 ส่วนมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์น้อยลง สำหรับสารสกัดหยาบไพลในชั้นเมทานอลเมื่อแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีได้สาร 5 ส่วน (M1-M5) ซึ่งสารสกัดในส่วนที่ 4 (M4) มีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ดีกว่าสารสกัดส่วนอื่น สำหรับสารสกัดไพลในส่วน H1 เมื่อนำมาตรวจสอบโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟฟี-แมสสเปกโทรเมตรี(GC-MS) พบว่ามีสารหลายชนิดผสมอยู่ในส่วนสกัดนี้ สำหรับสารสกัดไพลในส่วน H7 ซึ่งสามารถแยกด้วยคอลัมน์ โครมาโทกราฟฟีได้ง่าย เมื่อหาสูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) และเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟฟี-แมสสเปกโทรเมตรีพบว่าเป็นสาร (*E*)-4-(3,4-dimethoxy phenyl) but-3-en-1-ol และเมื่อนำไปทดสอบกับจุลินทรีย์ โดยหาค่าความเข้มข้นน้อยสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) โดยวิธี Broth Dilution ก็ให้ผลการยับยั้งดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Project	Effect of the Extracts from *Zingiber montanum* on Antimicrobial Activity
Researcher	Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul Asst. Prof. Patchanee Charoenying

Abstract

Rhizome of plai (*Zingiber montanum*) was sequential solvent extracted firstly by hexane followed by ethyl acetate and methanol that had crude extract of 2.98% 1.87% and 6.21% per dry weight, respectively. Crude extract was diluted with 5% tween 80 and antimicrobial activities of the extracts were then tested on 12 species of microbe by Agar Diffusion Method. The results showed that crude extract from hexane was effective to fungi, and was range from 7.87-19.27 mm. It could less inhibit the growth of bacteria and yeasts. The crude extract from ethyl acetate and methanol inhibited the growth of bacteria. Crude extract from hexane solvent was separated by column chromatography that gave 7 fractions (H1-H7). The first and seventh fraction of extract gave more the inhibition activities than other extracts. The first fraction gave the inhibition activities to all microbes and the seventh fraction gave the good inhibition activities to gram positive bacteria. Crude extract from ethyl acetate solvent was separated by column chromatography that gave 7 fractions (E1-E7) but they had less inhibitions activities. Crude extract from methanol solvent was separated by column chromatography that gave 5 fractions (M1-M5). The forth fraction (M4) gave more inhibition activities to yeasts and fungi. The first fraction of hexane extract was analyzed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) technique, found that consisted of complex fractions. The seventh fraction of hexane extract could separated fractions by chromatography. Analysis chemical structure of this substance by Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry (NMR) and GC-MS techniques, which was (*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl) but-3-en-1-ol. Antimicrobial activities of this substance tested by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by broth dilution method, inhibition activities gave more effective.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2548 ซึ่งสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือจาก นายเชฎฐ รัตนาจารย์ นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์และภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล
หัวหน้าโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....I

Abstract.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VIII

สารบัญภาพ.....X

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 ลักษณะของไพล.....4

2.2 การนำสมุนไพรมาใช้เป็นยา.....5

2.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช (Plant material preparation).....5

2.2.2 การสกัดสารออกฤทธิ์จากพืช (Extraction).....5

2.2.3 การทำสารสกัดให้เข้มข้น (Concentration).....7

2.2.4 การแยกส่วนผสม (Separation).....9

2.2.5 การตรวจสอบเอกลักษณ์ (Identification).....9

2.3 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial susceptibility test).....11

2.3.1 Disc diffusion method.....11

2.3.2 Dilution method.....12

2.4 จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ.....12

2.4.1 แบคทีเรีย (Bacteria).....12

2.4.2 ยีสต์ (Yeast).....14

2.4.3 ราที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (Filamentous fungi).....14

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....15

2.5.1 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของไพล.....15

2.5.2 ฤทธิ์ของสารสกัดไพลเมื่อทดลองกับผู้ป่วย.....16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5.3 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดไพล 16
2.5.4 โครงสร้างของสารประกอบที่เคยค้นพบในไพล 17
2.5.5 ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชในวงศ์ *Zingiberaceae* 18
2.5.6 งานวิจัยทางด้านอื่น 19
บทที่ 3 วิธีการทดลอง 20
3.1 แหล่งพืชสมุนไพรไพล 20
3.2 จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ 20
3.2.1 แบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ 20
3.2.2 เชื้อยีสต์ 2 สายพันธุ์ 20
3.2.3 เชื้อรา 4 สายพันธุ์ 20
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ และสารเคมี 21
3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 21
3.3.2 สารเคมี 21
3.4 อุปกรณ์ และเครื่องแก้ว 21
3.4.1 อุปกรณ์ 21
3.4.2 เครื่องแก้ว 22
3.5 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง 23
3.5.1 ขั้นตอนการสกัดสารจากไพล 23
3.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัด (ใช้ตัวเจือจางสารสกัดไพลชนิดต่างๆ) โดยวิธี Disc diffusion 23
3.5.3 การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นตัวทำละลายต่างๆ ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) 25
3.5.4 การแยกสารสกัดหยาบโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟี (Column Chromatography) ครั้งที่ 1 25
3.5.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดไพลในชั้นตัวทำละลายต่างๆ หลังจากแยกชั้นด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 1 โดยวิธี Disc diffusion 26
3.5.6 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดไพล โดยหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) โดยวิธี Broth dilution 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5.7 การแยกสารสกัดจากไพลโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 2 28

3.5.8 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดไพล หลังจากนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 2 หาค่า MIC โดยวิธี Broth dilution 28

3.5.9 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่แยกได้ 28

บทที่ 4 ผลการทดลอง 29

4.1 สารสกัดหยาบที่ได้จากไพล 29

4.2 การทดสอบหาตัวเจือจางสารสกัดหยาบไพล 29

4.3 ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากไพลโดยวิธี Disc diffusion 29

4.4 การศึกษาหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบในชั้นต่างๆ 35

4.5 การแยกสารสกัดหยาบไพลโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 1 35

4.6 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดไพลในชั้นตัวทำละลายต่างๆ หลังนำมาแยกชั้นด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 1 โดยวิธี Disc diffusion 37

4.6.1 การทดสอบสารสกัดไพลในชั้นเฮกเซน 37

4.6.2 การทดสอบสารสกัดไพลในชั้นเอทิล อะซิเตท 40

4.6.3 การทดสอบสารสกัดไพลในชั้นเมทานอล 43

4.7 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดไพลโดยหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ (MIC) โดยวิธี Broth dilution 46

4.8 การแยกสารสกัดจากไพลโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 2 49

4.9 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดไพลหลังจากนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 2 โดยหาค่า MIC ด้วยวิธี Broth dilution 49

4.10 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างสารที่แยกได้ 55

4.10.1 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรเมตรีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) 55

4.10.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) 59

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 61

เอกสารอ้างอิง 63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 แสดงลักษณะของสารสกัดหยาบไพล และร้อยละของสารที่สกัดได้ 29

4.2 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายต่างๆ โดยวิธี Disc diffusion และเปรียบเทียบการเจือจางสารสกัดไพลด้วย 10%DMSO 5%tween80 และ 1%tween80 31

4.3 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดหยาบไพลในชั้นของเฮกเซน โดยวิธี Disc diffusion และเปรียบเทียบการเจือจางสารสกัดไพลด้วย DMSO ร้อยละ 10 tween80 ร้อยละ 5 และ tween80 ร้อยละ 1 32

4.4 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดหยาบไพลในชั้นของเอทิล อะซิเตท โดยวิธี Disc diffusion และเปรียบเทียบการเจือจางสารสกัดไพลด้วย DMSO ร้อยละ 10 tween80 ร้อยละ 5 และ tween80 ร้อยละ 1 33

4.5 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดหยาบไพลในชั้นของเมทานอล โดยวิธี Disc diffusion และเปรียบเทียบการเจือจางสารสกัดไพลด้วย DMSO ร้อยละ 10 tween80 ร้อยละ 5 และ tween80 ร้อยละ 1 34

4.6 แสดงสัดส่วนของระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบไพล 35

4.7 แสดงลักษณะของสารสกัดไพลหลังการแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 1 และปริมาณของสารที่แยกได้ 36

4.8 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนแต่ละส่วนที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี โดยวิธี Disc diffusion 38

4.9 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนแต่ละส่วน ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีโดยวิธี Disc diffusion 39

4.10 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทแต่ละส่วน ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี โดยวิธี Disc diffusion 41

4.11 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเอทิล อะซิเตทแต่ละส่วน ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี โดยวิธี Disc diffusion 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.12 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเมทานอลแต่ละส่วน ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีโดยวิธี Disc diffusion 44

4.13 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเมทานอลแต่ละส่วน ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีโดยวิธี Disc diffusion 45

4.14 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของส่วนสกัดไพลภายหลังการแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 1 ด้วยวิธี Broth Dilution 47

4.15 แสดงลักษณะของสารสกัดไพลภายหลังการแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 2 และปริมาณของสารที่แยกได้ 49

4.16 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของส่วนสกัดไพลภายหลังการแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 2 ด้วยวิธี Broth Dilution 50

4.17 แสดง ^{1}H chemical shift (δ) ที่น่าสนใจ และตำแหน่งของโปรตรอน 56

4.18 แสดง ^{13}C chemical shift (δ) ที่น่าสนใจ และตำแหน่งของคาร์บอน 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

2.1 แสดงลักษณะและส่วนประกอบของต้นไพล 4

2.2 แสดงเครื่องระเหยแบบหมุนพร้อมลดความดัน (rotary evaporator) 8

2.3 แสดงการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี Disc diffusion 11

2.4 แสดงการเจือจางแบบลดลงครึ่งหนึ่ง (Two-fold serial dilution) 12

2.5 แสดงสูตรโครงสร้างของสาร D, D-acetate และ D-palmitate 17

2.6 แสดง Phenylbutenol monomer 7 ชนิดที่ค้นพบ 18

3.1 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดที่เติมลงในหลุม Microtiter plate หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 28

4.25 แสดง ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสาร (*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol 57

4.26 แสดง ^{13}C-NMR สเปกตรัมของสาร (*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol 58

4.27 แสดงสูตรโครงสร้างของสาร (*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol 59

4.28 แสดงผลสเปกโทรมิตรีชนิดมวล (MS) เปรียบเทียบกับสาร (*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol ในฐานข้อมูล (Library) 60

5.1 แสดงสูตรโครงสร้างของสาร (*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol 62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สมุนไพร นับเป็นยาสำหรับรักษาโรคต่างๆได้มากมาย โดยสมุนไพรที่นำเอามาเป็นส่วนประกอบของยารักษาโรคของคนเรานั้นได้รับการอนุญาตให้ใช้รักษาความเจ็บไข้ได้ป่วยของมนุษย์เราได้ โดยในพระราชบัญญัติคุ้มครองและส่งเสริมภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย พ.ศ.2542 ให้ความหมายของสมุนไพรว่าเป็น พืช สัตว์ จุลชีพ ธาตุวัตถุ สารสกัดดั้งเดิมจากพืชหรือสัตว์ที่ใช้แปรสภาพ ผสม ปรุงเป็นยาหรืออาหาร เพื่อการตรวจวินิจฉัย บำบัด รักษา ป้องกันโรค ส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์หรือสัตว์ และให้หมายความรวมถึงถิ่นกำเนิดหรือถิ่นที่อยู่ของสิ่งดังกล่าวด้วย ในเอเชียก็มีหลักฐานแสดงว่ามนุษย์รู้จักใช้พืชสมุนไพรมากว่า 6,000 ปี แต่หลังจากที่ความรู้ด้านวิทยาศาสตร์มีการพัฒนาเจริญก้าวหน้ามากขึ้นมีการสังเคราะห์ และผลิตยาจากสารเคมีในรูปที่ใช้ประโยชน์ได้ง่าย ทำให้ความนิยมใช้ยาสมุนไพรลดลง เป็นเหตุให้ความรู้วิทยาการด้านสมุนไพรขาดการพัฒนาไม่เจริญก้าวหน้าเท่าที่ควร ในปัจจุบันทั่วโลกได้ยอมรับแล้วว่าสารที่ได้จากการสกัดพืชสมุนไพร ให้คุณประโยชน์ดีกว่ายาที่ได้จากการสังเคราะห์ทางวิทยาศาสตร์ประกอบกับในประเทศไทยเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติอันอุดมสมบูรณ์ มีพืชต่างๆที่ใช้เป็นสมุนไพรได้อย่างมากมาย ยังขาดก็แต่เพียงการค้นคว้าวิจัยในทางที่เป็นวิทยาศาสตร์มากขึ้นเท่านั้น ความตื่นตัวที่จะพัฒนาความรู้ด้านพืชสมุนไพรจึงเริ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่ง มีการเริ่มต้นนโยบายสาธารณสุขขั้นมูลฐานอย่างเป็นทางการของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2522 โดยเพิ่มโครงการสาธารณสุขขั้นมูลฐานเข้าในแผนพัฒนาการสาธารณสุข ตามแผนพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 4 (พ.ศ. 2520 – 2524) ต่อเนื่องจนถึงแผนพัฒนาการเศรษฐกิจ และสังคมแห่งชาติฉบับที่ 7 (พ.ศ. 2535 – 2539)

พืชสมุนไพร เมื่อนำมาปรุงยารักษาโรคต่าง ๆ นั้น แพทย์แผนโบราณใช้ พืชสมุนไพรได้ทั้งสดๆ และตากแห้ง ในการใช้พืชสมุนไพรแบบสดนั้น เป็นวิธีการที่สะดวกมากใช้ง่าย แต่ฤทธิ์ของตัวยาที่มีอยู่ในสมุนไพรอาจจะไม่คงที่ การใช้สมุนไพรส่วนมากนิยมใช้แบบแห้งเพราะจะได้คุณค่าของยาที่คงที่ โดยเลือกเก็บสมุนไพรที่ต้องการตามฤดูกาลเก็บของพืช แล้วนำเอามาแปลงสภาพโดยผ่านขบวนการที่เหมาะสมเพื่อเก็บยาเอาไว้ได้เป็นเวลานาน ในการแปลงสภาพยาที่เหมาะสมนั้น โดยทั่วไปก็จะต้องนำส่วนที่ใช้เป็นยามาผ่านการคัดเลือก ผ่านการล้าง การตัดเป็นชิ้นที่เหมะสม แล้วใช้ความร้อนทำให้แห้งเพื่อสะดวกในการเก็บรักษา และสามารถนำสมุนไพรแห้งมาสกัดสารภายในออกมา จะได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ของตัวยาที่คงที่มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไพล *Zingiber montanum* (Koen.) Thilade เป็นพืชสมุนไพรวงศ์ *Zingiberaceae* มีเหง้าใต้ดิน นิยมใช้เหง้าสดเป็นยาภายนอก ฝนทาแก้เคล็ดยอก ฟกบวม เส้นตึง เมื่อยขบ เหน็บชา สมานแผล จากการวิจัยพบว่าในเหง้ามีน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีคุณสมบัติลดอาการอักเสบและบวม จึงมีการผลิตยาขี้ผึ้งผสมน้ำมันไพลเพื่อใช้เป็นยาแก้อาการเคล็ดขัดยอก น้ำมันไพลผสมแอลกอฮอล์สามารถทากันยุงได้ ใช้เหง้ากินเป็นยา ขับลม ขับประจำเดือน มีฤทธิ์ระบายอ่อนๆ แก้บิด สมานลำไส้ นอกจากนั้นพบว่าในเหง้ามีสาร 4-(4-hydroxyl-1-butenyl) veratrole ซึ่งมีฤทธิ์ขยายหลอดลม ได้ทดลองใช้ผงไพลกับผู้ป่วยเด็กที่เป็นหืด สรุปได้ว่าให้ผลดี ทั้งในรายที่มีอาการหอบหืดแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง (ประพาพ และคณะ. 2528)

มีงานวิจัยต่างๆมากมายเกี่ยวกับพืชสมุนไพรไพล เช่น จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากไพลโดยใช้เฮกเซนเป็นตัวสกัดสามารถลดอาการชักกระตุกของกล้ามเนื้อในส่วนลำไส้ของหนูได้ (Dechatiwongse and Yoshihira. 1973) และแยกน้ำมันหอมระเหยจากไพลนำมาใช้เป็นสารไล่ยุงได้ (Dechatiwongse. 1979) มีการสกัดสารจากไพลโดยใช้แอลกอฮอล์และเฮกเซนนำมาทดสอบความเป็นพิษกับหนูพบว่าสารสกัดจากไพลไม่มีพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังในหนูทั้งในระยะสั้นและระยะยาว (รังสรรค์ และคณะ. 2529) Habsah และคณะ (2000) ได้สกัดสารจากพืชในวงศ์ *Zingiberaceae* 13 ชนิด โดยใช้ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดในส่วนของเมทานอลสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีและสามารถยับยั้งเชื้อราได้เฉพาะ *Aspergillus ochraceous* สารสกัดที่สกัดได้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้เท่ากับหรือมากกว่า α-tocophenol สำหรับประเทศไทยการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์จากพืชสมุนไพรไพลยังมีน้อย จึงได้สนใจทำการศึกษาในเรื่องนี้ รวมทั้งเป็นแนวทางในการศึกษาเพื่อให้ทราบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพในการนำพืชสมุนไพรไพลไปใช้ประโยชน์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบ (Crude extract) จากพืชสมุนไพรไพลโดยใช้ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

1.2.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

1.2.3 ศึกษาความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไพลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

1.2.4 แยกสารชีวภาพที่มีศักยภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 สกัดสารจากไพลโดยวิธี Sequential Solvent Extraction

1.3.2 ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากไพลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

1.3.3 หาความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้

1.3.4 ทำการแยกสารสกัดให้ได้สารสำคัญที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถแยกสารชีวภาพจากพืชสมุนไพรไพลมาใช้ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

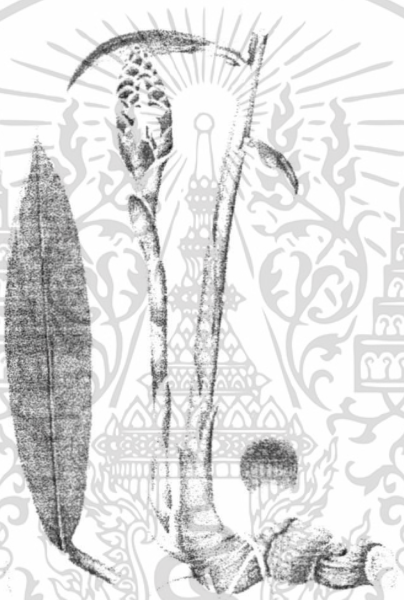
1.4.2 สามารถใช้สารชีวภาพเป็นสารต้นแบบในการสังเคราะห์สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ใกล้เคียงหรือดีกว่าได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะของไพล

ไพลมีชื่อวิทยาศาสตร์ : *Zingiber montanum* (Koen.) Thilade (รูปที่ 2.1) มีชื่อพ้องว่า *Zingiber cassumunar* Roxb. *Zingiber purpureum* Roscoe. ชื่อสามัญคือไพล ปูลอย ปูเลย ว่านไฟ มิ้นสะล่าง อยู่ในวงศ์ *Zingiberaceae* (วุฒิ. 2540)



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะและส่วนประกอบของต้นไพล
ที่มา : http://www.medplant.mahidol.ac.th

ไพลเป็นไม้ล้มลุก สูง 0.7 – 1.5 ม. มีเหง้าใต้ดิน เปลือกนอกสีน้ำตาลแกมเหลือง เนื้อในสีเหลืองแกมเขียวมีกลิ่นเฉพาะ การเจริญจะแทงหน่อหรือลำต้นเทียมขึ้นเป็นกอ ประกอบด้วยกาบหรือโคนใบหุ้มซ้อนกันใบเดียวเรียงสลับ ใบรูปหอกกว้าง 3.5 – 5.5 ซม. ยาว 18 – 35 ซม. ช่อดอกแทงจากเหง้าใต้ดิน กลีบดอกสีขาวนวลใบประดับสีม่วงแดง ผลเป็นผลแห้งรูปกลม ส่วนที่ใช้ประโยชน์คือ เหง้า สรรพคุณ ทาถูนวดแก้ปวดเมื่อย ลดการอักเสบ

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในปลูก ควรเป็นดินเหนียวปนทรายที่มีอินทรียวัตถุสูง มีการระบายน้ำดี ปลูกได้ทั้งที่แจ้งและที่ร่ม ควรหลีกเลี่ยงการปลูกในดินลูกรังและพื้นที่น้ำขัง การ

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขยายพันธุ์ เตรียมเหง้าพันธุ์ ต้องเป็นหัวพันธุ์ที่มีอายุมากกว่า 1 ปี มีตาสมบูรณ์ ไม่มีโรคแมลงเข้าทำลาย ปล่อยให้หัวพันธุ์พักตัวในระยะเวลาหนึ่ง แล้วทำการแช่ใน Indole Acetic Acid (IAA) ที่ระดับความเข้มข้น 250 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 24 ชม. จะช่วยกระตุ้นให้หัวไพลงอกได้เร็วขึ้น จะทำให้ได้ผลผลิตสูงขึ้น โดยแบ่งหัวพันธุ์ให้มีน้ำหนัก 100 กรัม/หัว มีตา 3 – 5 ตา และชุบท่อนพันธุ์ด้วยสารเคมีป้องกันเชื้อราก่อนปลูก ระยะแรกของการปลูกต้องดูแลอย่าให้พืชขาดน้ำ ต้องรดน้ำสม่ำเสมอจนกว่าพืชจะตั้งตัวได้ หลังจากนั้นก็ควรให้น้ำบ้างอย่างน้อย สัปดาห์ละ 1 ครั้ง การให้ปุ๋ยใส่ปุ๋ย N : P : K ในอัตราส่วน 12 : 6 : 6 กก./ไร่ จะให้ผลผลิตสูงสุด การเก็บเกี่ยวมีระยะเวลาเก็บเกี่ยวตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงวันที่เก็บเกี่ยวผลผลิตไพลจะใช้ระยะเวลานาน 2 – 3 ปี เป็นระยะเวลาที่เหมาะสม ในการนำไพลไปสกัดน้ำมัน จะได้ปริมาณน้ำมันมากและมีคุณภาพ เก็บหัวไพลช่วงเดือนมกราคม-มีนาคม จะสังเกตเห็นต้นไพลแห้งและฟุบลงกับพื้น ห้ามเก็บหัวไพลขณะที่เริ่มแตกหน่อใหม่ เพราะจะทำให้ได้น้ำมันไพลที่มีปริมาณและคุณภาพต่ำ (กลุ่มพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ. 2543)

2.2 การนำสมุนไพรมาใช้เป็นยา

มนุษย์เรารู้จักเอาสมุนไพรมาใช้เป็นยาตั้งแต่สมัยโบราณ เดิมนำมาใช้ในรูปของพืชสด พืชแห้ง ต่อมาจึงพัฒนายาเตรียมง่ายๆ (Galenical preparation) ชนิดต่างๆ แล้วได้มีวิวัฒนาการเพื่อให้ได้ยาที่มีรูปแบบน่าใช้และให้ผลการรักษาแน่นอน จึงได้มีการสกัดสารสำคัญในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามาใช้เป็นยาในรูปสารบริสุทธิ์ และในปัจจุบันได้มีการนำเอาพืชสมุนไพรมาผลิตเป็นยาในรูปแบบต่างๆ (วันดี. 2536) ซึ่งการนำเอาสมุนไพรมาใช้เป็นยาต้องผ่านขั้นตอน ดังนี้

2.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช (Plant material preparation)

การเตรียมตัวอย่างพืชต้องคำนึงถึง ผลของสารสำคัญในพืช คือ การตรวจเอกลักษณ์ของพืชที่ถูกต้อง ไม่มีพืชอื่นปน ไม่มีโรคพืช อายุพืชที่ผลิตสารสำคัญ และการเก็บรักษา การเตรียมตัวอย่างทำได้โดยทำสมุนไพรให้แห้งเพื่อคงคุณภาพของสมุนไพรไว้ ควรจะทำให้แห้งโดยวิธีที่เร็วและใช้อุณหภูมิต่ำๆ เพราะอุณหภูมิสูงจะทำให้สารสำคัญสลายหรือเปลี่ยนแปลง

2.2.2 การสกัดสารออกฤทธิ์จากพืช (Extraction)

การสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชอาจทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับ ชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดในการใช้ วิธีเหล่านี้ ได้แก่

2.2.2.1 การสกัดโดยวิธีการหมัก (Maceration) เป็นวิธีการสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือโถ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นต้น ทิ้งไว้ 7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อยๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยๆ รินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกากให้ได้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้นำไปกรอง การสกัดถ้าจะสกัดให้หมด อาจจำเป็นต้องสกัดซ้ำหลายครั้งๆ วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก แต่เนื่องจากกระบวนการสกัดด้วยวิธี Maceration ช้า จึงมีผู้ดัดแปลงใช้ Homogenizer มาช่วยทำให้เซลล์พืชแตกออก การสกัดจึงเร็วขึ้น เรียกวิธีการสกัดนี้ว่า Vortical extraction ซึ่งต่อมาได้พัฒนาใช้ Ultrasound extraction โดยใช้เสียงที่มีความถี่สูงเกิน 20,000 Hz

2.2.2.2 การสกัดโดยปล่อยไหล (Percolation) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Percolator นำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายพอชื้น ทิ้งไว้หนึ่งชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อยๆบรรจุผงยาทีละน้อยเป็นชั้นลง Percolator เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพร (Solvent head) ประมาณ 0.5 ซม. ทิ้งไว้ 24 ชม. จึงเริ่มไขเอาสารสกัดออกโดยคอยเติมตัวทำละลายเหนือสมุนไพรอย่าให้แห้งเก็บสารสกัดจนการสกัดสมบูรณ์ บีบกากเอาสารสกัดออกให้มากที่สุด นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกันนำไปกรอง และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารในขั้นอุตสาหกรรม ใช้ Percolator ต่อกันหลายตัว เรียกว่า Countercurrent-operated percolator battery และมีการดัดแปลงวิธีการสกัดให้มีการเคลื่อนที่ของสารที่จะสกัดและตัวทำละลายเข้าหากัน เรียกว่า Counter current extraction

2.2.2.3 การสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet extractor เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในฟลาสก์ระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาบนทิมเบิลซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน Extraction chamber สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปในฟลาสก์ด้วยวิธีการกาลักน้ำ ฟลาสก์นี้ได้รับความร้อนจากเตาให้ความร้อนหรือหม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไปทิ้งสารสกัดไว้ในฟลาสก์ ตัวทำละลายเมื่อกระทบคอนเดนเซอร์จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนด้วยจึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัว

2.2.2.4 การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (Liquid-liquid Extraction) เป็นการสกัดสารจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรกแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

2.2.2.4.1 Extractant lighter คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดเบากว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

2.2.2.4.2 Raffinate lighter คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดหนักกว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.5 การสกัดน้ำมันหอมระเหย (Extraction of volatile oil)

2.2.2.5.1 การสกัดด้วยวิธีดูดซับ (Resorption) เป็นวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีดูดซับ โดยมากใช้สกัดกลีบดอกเพื่อทำน้ำหอม

2.2.2.5.2 การสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม (Solvent extraction) เช่น สกัดน้ำมันกานพลูโดยใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์

2.2.2.5.3 การสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีบีบ (Mechanical extraction) เช่น นำเปลือกผลส้มไปบีบจะได้ชั้นน้ำกับน้ำมัน ซึ่งแยกน้ำมันหอมระเหยออก โดยการปั่นเหวี่ยง

2.2.2.5.4 การกลั่นโดยใช้ไอน้ำ (Steam distillation) เป็นการกลั่นโดยผ่านไอน้ำไปบนสมุนไพรซึ่งบรรจุไว้ในฟลาสก์พร้อมกับน้ำ ไอน้ำจะพาเอาน้ำมันหอมระเหยไปยังคอนเดนเซอร์แล้วกลั่นตัวเป็นของเหลว เมื่อทิ้งไว้น้ำมันจะแยกตัวออกจากน้ำ

2.2.2.5.5 การกลั่นน้ำมันหอมระเหยโดยต้มกับน้ำ (Water distillation) เมื่อน้ำและน้ำมันหอมระเหยระเหยขึ้นไปถึงคอนเดนเซอร์จะกลั่นตัวตกสู่ภาชนะบรรจุ แล้วจึงนำของเหลวที่ได้ไปแยกน้ำมันหอมระเหยจากชั้นน้ำ เครื่องมือที่ใช้ คือ Clevenger-type apparatus ซึ่งมีชนิดสำหรับน้ำมันหอมระเหยซึ่งหนักกว่าน้ำ และสำหรับน้ำมันหอมระเหยที่เบากว่าน้ำ

2.2.2.5.6 การสกัดน้ำมันพืช การสกัดน้ำมันพืชจากเมล็ดพืชอาจทำได้โดยใช้ความร้อนหรือไม่ใช้ความร้อนก็ได้ การบีบโดยใช้ความร้อนจะได้น้ำมันออกมามากกว่า แต่จะบริสุทธิ์น้อยกว่า เครื่องมือที่ใช้บีบน้ำมันทางอุตสาหกรรมที่นิยมกันคือเครื่องบีบชนิดเกลียว (Screw press หรือ Expeller) เมื่อหมุนเกลียวเข้าไปจะเกิดแรงกดทำให้เมล็ดพืชแตกออก ให้น้ำมันไหลออกมาทางหนึ่ง ส่วนกากจะไหลออกอีกทางหนึ่ง กากที่ได้จากการบีบนี้มักยังมีน้ำมันค้างอยู่ 2-4 เปอร์เซ็นต์ ในทางอุตสาหกรรมจึงมักจะนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน อีกครั้งหนึ่ง

2.2.2.6 การสกัดสารปริมาณน้อยด้วยการกลั่นโดยใช้ความร้อน เป็นการสกัดสารโดยเครื่องมือ Thermomicro Analysis and Separation ovens (TAS ovens) เป็นการสกัดสารขนาดน้อยมาก นำสารใส่ลงในลำกล้อง (Cartridge) ซึ่งข้างหนึ่งปิดปลายแล้ว ปลายอีกข้างหนึ่งเป็นท่อเล็กๆ (Capillaries) เมื่อใส่เข้าในเตาอบ ความร้อนจะทำให้สารละลายระเหยหรือระเหิดออกมา Capillaries รองรับสารที่ระเหยหรือระเหิดออกมาด้วยแผ่นโครมาโทกราฟฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) แล้วนำไปตรวจสอบอีกทีหนึ่ง

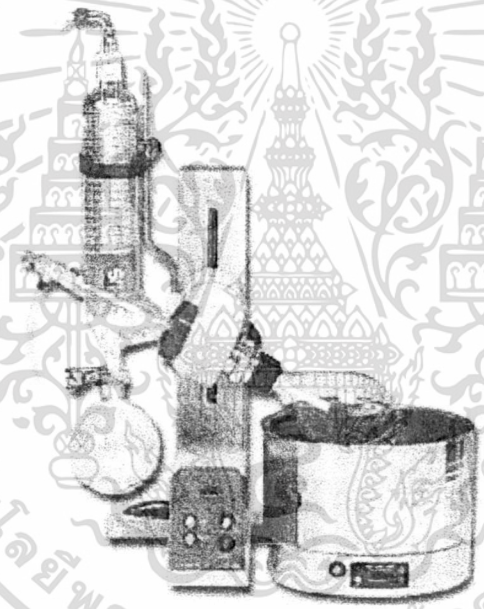
2.2.3 การทำสารสกัดให้เข้มข้น (Concentration)

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้มักมีปริมาณมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกส่วนได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนซึ่งอาจทำได้หลายวิธีคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.1 การระเหยแห้งโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (Free Evaporation) คือระเหยให้แห้งโดยใช้หม้ออังไอน้ำหรือแผ่นให้ความร้อน บางครั้งอาจจะเป่าอากาศร้อนลงไปในสารสกัดด้วยเพื่อให้ระเหยได้เร็ว

2.2.3.2 การระเหยแห้งโดยกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันให้เกือบเป็นสุญญากาศ (Distillation in vacuo) ระเหยแห้งและลดความดันโดยใช้ Vacuum pump เครื่องมือนี้เรียกว่า Rotary evaporator (ดังรูปที่ 2.2) ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ Distillation flask, Condenser และ Receiving flask โดยที่ Distillation flask จะหมุนอยู่ตลอดเวลาที่ทำงาน และแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำเพื่อให้กระจายความร้อนได้ทั่วถึงและสม่ำเสมอ เครื่องมือที่ดีจะต้องมีระบบการทำสุญญากาศที่ดี ระยะระหว่าง Distillation flask และ Condenser สั้น และมีระบบทำความเย็นของ Condenser ที่ดี



รูปที่ 2.2 แสดงเครื่องระเหยแบบหมุนพร้อมลดความดัน **(rotary evaporator)**

ที่มา : http://www.lab123.com

2.2.3.3 การแช่แข็ง (Freezing) สารสกัดด้วยน้ำใช้ Lyophilizer หรือFreezedryer แต่ถ้าเป็นตัวทำละลายอื่นเฉพาะตัวทำละลายเท่านั้นที่แข็ง ซึ่งเราแยกจาก Concentrated extract โดยการปั่นเหวี่ยง

2.2.3.4 การทำสารสกัดให้เข้มข้นโดยใช้แผ่นกรอง (Ultrafiltration) เป็นการทำให้เข้มข้นโดยใช้เมมเบรนใช้กับสารที่น้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 5,000 ดาลตัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 การแยกส่วนผสม (Separation)

ในการแยกสารสกัดที่ได้เบื้องต้นซึ่งเป็นส่วนผสมของสารเคมีเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ นั้นจำเป็นต้องอาศัยวิธีการแยกโดยใช้เทคนิค คือ

2.2.4.1 Thin Layer Chromatography (TLC)

เป็นการแยกสารผสมโดยใช้ Stationary phase คือ ซิลิกาเจลเคลือบบนแผ่นอลูมิเนียม (แผ่น TLC) เมื่อหยดสารผสมลงบน Stationary phase แล้วจึงนำแผ่น TLC ที่ได้ไปใส่ใน tank ซึ่งบรรจุ Mobile phase ที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดกระบวนการเคลื่อนที่ของสารสกัดบน Stationary phase เพื่อให้สารผสมแยกออกจากกัน

2.2.4.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟฟี

เป็นวิธีการแยกสารผสมโดยให้สารเคลื่อนที่ไปบน Stationary phase คือซิลิกาเจล ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดแก้วกลวง ใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็น Mobile phase แล้วสารจะเคลื่อนที่ผ่าน Stationary phase เพื่อแยกสารผสมออกจากกัน

2.2.5 การตรวจสอบเอกลักษณ์ (Identification)

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของสาร เป็นการวิเคราะห์สารที่แยกออกมาจากส่วนผสมในสารสกัดโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรโฟโทเมตรีต่างๆ

2.2.5.1 สเปกโทรเมตรีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR)

สเปกโทรเมตรีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry, NMR) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการดูดกลืนพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้าโดยในสเปกโทรเมตรีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ นิวเคลียสที่ถูกวางอยู่ในสนามแม่เหล็กที่มีความแรงค่าหนึ่งๆ จะสามารถดูดกลืนพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงความถี่คลื่นวิทยุ ที่เหมาะสมแล้วเปลี่ยนระดับพลังงานขึ้นไปสู่ระดับพลังงานที่สูงขึ้น หากนิวเคลียสที่ศึกษาเป็นนิวเคลียสของอะตอมของไฮโดรเจนหรือโปรตอนก็จะเรียกว่า นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของโปรตอน (Proton NMR, ^{1}H-NMR) ซึ่งจะให้รายละเอียดเกี่ยวกับจำนวนและชนิดของโปรตอนที่อยู่ในโมเลกุลนั้นๆ และถ้าเป็นนิวเคลียสของคาร์บอนจะเรียกว่า นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของคาร์บอน (Carbon NMR, ^{13}C-NMR) ข้อมูลทางด้านนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์นี้เมื่อใช้ประกอบกับข้อมูลที่ได้จากสเปกโทรเมตรีอัลตราไวโอเลต สเปกโทรเมตรีอินฟราเรด และสเปกโทรเมตรีชนิดมวล (Mass Spectrometry, MS) จะเป็นประโยชน์ในการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของอินทรียสาร (อรอุมา. 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5.2 แก๊สโครมาโทกราฟฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS)

แก๊สโครมาโทกราฟฟี (GC) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกและวิเคราะห์สารผสมที่ระเหยเป็นไอได้ง่าย (Volatile compound) เมื่อสารผสมที่ระเหยกลายเป็นไอถูกผ่านเข้าไปในคอลัมน์ที่มีตัวแยกเป็นเฟสที่อยู่กับที่ สารผสมดังกล่าวจะถูกแก๊สที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ชะออกจากคอลัมน์ ดังนั้นการแยกสารผสมด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟฟีส่วนใหญ่จะขึ้นอยู่กับจุดเดือดที่ต่างกันของสารผสม มวลโมเลกุล และสูตรโครงสร้างที่ต่างกันของสารผสม (นิพนธ์. 2534)

แก๊สโครมาโทกราฟฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) เป็นเครื่องวิเคราะห์สารเคมีที่ใช้เทคนิคในการแยกสารผสมที่ระเหยได้ง่าย โดยมีแก๊สเป็นตัวพา (Carrier gas) ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ทั้งด้านปริมาณวิเคราะห์ และคุณภาพวิเคราะห์ โดยใช้หลักการวิเคราะห์หาค่ามวลต่อประจุ (m/e) โดย Mass filter เป็นแบบ Quadrupole ที่สามารถตรวจพิสูจน์ชนิดและโครงสร้างของสารประกอบได้ โดยเปรียบเทียบไอออนย่อย (Fragment ion) กับ Mass Spectrum Libraries โดยที่ไอออนย่อยเกิดจากการแตกหักของสารประกอบ ที่ถูกระดมยิงด้วยอิเล็คตรอนพลังงานสูง ซึ่งสารประกอบแต่ละชนิดมีรูปแบบการแตกหัก (Fragmentation patterns) ที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว พร้อมทั้งคำนวณหาปริมาณสารได้โดยการเลือกไอออนที่ต้องการ (Selected Ion Monitoring, SIM) ซึ่งมีความไว (Sensitivity) สูงมากสามารถตรวจวัดสารได้ในระดับพีโคกรัม โดยทำงานแบบอัตโนมัติด้วยระบบคอมพิวเตอร์ (ในปัจจุบันมี Mass Spectrum Libraries มากกว่าสี่แสนชนิด)

สามารถนำมาใช้ประยุกต์ ในงานวิเคราะห์สารประกอบที่เป็นของผสม ที่สามารถระเหยได้ทั้งของแข็ง ของเหลว และแก๊ส เพื่อศึกษาการตรวจพิสูจน์ในกรณีที่วิเคราะห์ด้วย GC ไม่อาจยืนยันผลได้ ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในงานตรวจวัดทางนิติวิทยาศาสตร์ได้ดังนี้

1. ตรวจพิสูจน์หาชนิดและปริมาณของยาเสพติด และสารพิษ
2. ตรวจพิสูจน์หาชนิดและปริมาณของแก๊สพิษ เช่น แก๊ส Sarin แก๊ส Mustard
3. ตรวจพิสูจน์หาชนิดของผ้า หรือเส้นใย

อินทรียสารทั้งที่ได้จากการสังเคราะห์ (Synthetic Product) หรือที่เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural Product) ภายหลังจากการทำให้เป็นสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การตกผลึก หรือกระบวนการทางโครมาโทกราฟฟี แล้วจึงนำมาศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เพื่อเปรียบเทียบกับอินทรียสารที่มีผู้สังเคราะห์หรือค้นพบมาก่อน หากเป็นสารใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับคุณสมบัติทางกายภาพหรือโครงสร้างทางเคมีไว้แล้ว การอธิบายหรือการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารนั้นจำเป็นต้องอาศัยวิธีการทางสเปกโทรเมตรี ได้แก่ สเปกโทรเมตรีอัลตราไวโอเลต สเปกโทรเมตรีอินฟราเรด สเปกโทรเมตรีชนิดมวล และสเปกโทรเมตรีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

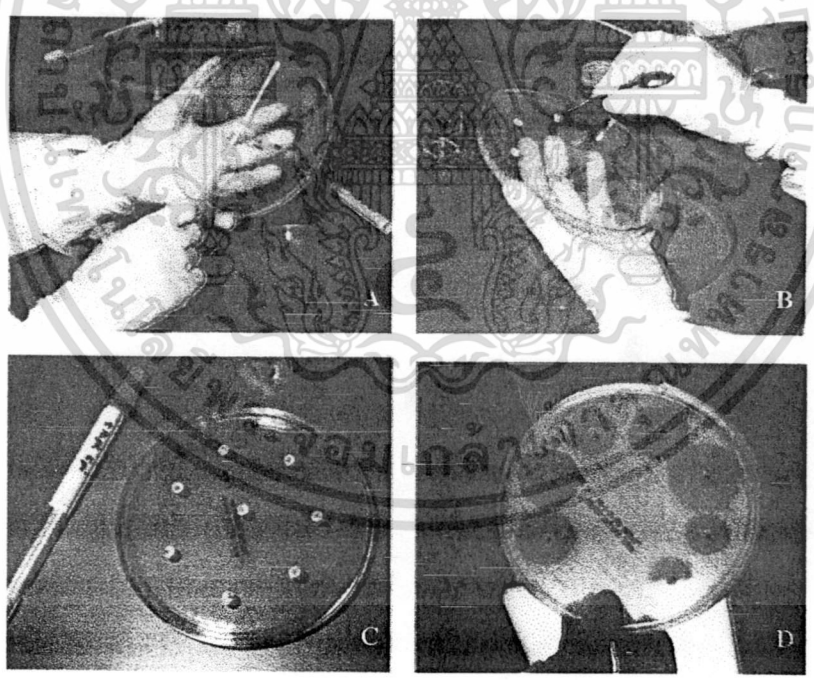
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial susceptibility test)

การใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อรักษาโรคติดเชื้อนั้น นอกจากว่าจะขึ้นอยู่กับระดับของยาตรงบริเวณเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อแล้ว ยังขึ้นกับความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพชนิดนั้นๆ (กมลชัย. 2543) ความไวต่อยาของเชื้อแบคทีเรียสามารถทำการทดสอบได้ 2 วิธี คือ

2.3.1 Disc diffusion method

การทดสอบวิธีนี้จะทำให้ทราบถึงว่ายาชนิดใดไวต่อเชื้อที่ทดสอบ โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์แล้ว (Pure culture) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (Agar) แล้ววางกระดาษกรองวงกลมที่มียาต้านจุลชีพที่ต้องการทดสอบซึ่งรู้ถึงความเข้มข้นลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น จากนั้นใส่ตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงวัด Inhibition zone (Clear zone) รอบกระดาษกรองนั้น และนำค่าที่ได้มาแปลผลว่าเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบไวหรือดื้อยา (แสดงดังรูป 2.3)



รูปที่ 2.3 แสดงการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี Disc diffusion

ที่มา : http://www.botanik.univie.ac.at/phytoch

รูป A แสดงการป้ายเชื้อบนอาหารแข็ง (Swap)

รูป B แสดงการวางแผ่น disc ของสารสกัดบนอาหารแข็ง

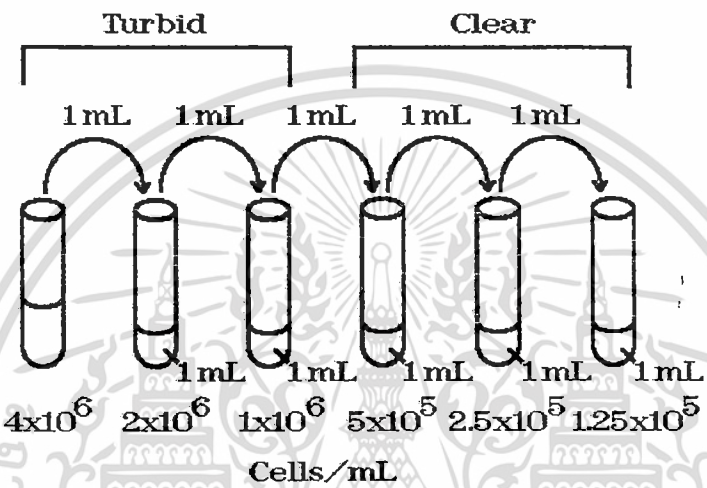
รูป C แสดงการติดฉลาก แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

รูป D แสดง Clear zone เป็นบริเวณที่สารสกัดยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 Dilution method

การทดสอบวิธีนี้จะทำให้ทราบถึงระดับยาที่มีผลต่อเชื้อที่ทดสอบ ทำให้สามารถกำหนดขนาดยาที่จะใช้ได้ โดยทำสารละลายยาต้านจุลชีพแบบ Two-fold serial dilution (รูปที่ 2.4) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (Broth) แล้วจึงใส่เชื้อแบคทีเรียที่ทราบปริมาณ (โดยเทียบค่ากับ McFarland standard) จากนั้นใส่ตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผลที่เกิดขึ้น ความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เรียกว่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC)



รูปที่ 2.4 แสดงการเจือจางแบบลดลงครึ่งหนึ่ง (Two-fold serial dilution)

ที่มา : http://www.phys.ksu.edu/gene/d2f1.html

2.4 จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ

2.4.1 แบคทีเรีย (Bacteria)

2.4.1.1 *Bacillus cereus* จัดอยู่ในวงศ์ *Bacillaceae* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษชนิดไม่รุนแรง ทำให้เกิดอาการท้องร่วงภายหลังรับประทานอาหารที่มีเชื้อ 10^6 เซลล์ต่อกรัมของอาหารขึ้นไป จะเกิดอาการภายใน 8 – 18 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการอ่อนเพลียและดีขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง ในเด็กอ่อนหรือผู้สูงอายุอาจพบอันตรายถึงตายได้ อาหารที่พบเชื้อนี้ได้แก่ ธัญพืช ผัก และวัตถุดิบในการผลิตอาหาร การตรวจพบในปริมาณน้อยกว่า 10^6 เซลล์ต่อกรัม ไม่ยืนยันการเกิดอาหารเป็นพิษ

2.4.1.2 *Bacillus subtilis* จัดอยู่ในวงศ์ *Bacillaceae* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.7-0.8 x 2-3 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นสาย สร้างเอ็นโดสปอร์ (Endospore) 1 อันต่อเซลล์ ขนาด 0.5 x 1.5-1.8 ไมโครเมตร เชื้อสร้างเอกโซเอนไซม์ ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แป้ง แพคติน และเคซินได้ ชอบอุณหภูมิปานกลาง อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 45 – 55 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปเชื้อนี้จะไม่ก่อโรคในคนปกติ

2.4.1.3 *Staphylococcus aureus* จัดอยู่ในวงศ์ *Micrococaceae* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7-1.2 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นกลุ่ม ไม่เคลื่อนที่ เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดด่างที่ 4.8 -7.4 โคโลนีมีลักษณะนูน ทึบแสง เป็นมัน ขนาด 1 – 2 มิลลิเมตร มีสีเหลืองทอง สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆได้ดี มักพบบริเวณผิวมันและเยื่อบุเมือก หรือบริเวณลำคอส่วน Oropharynx และ Nasopharynx *S. aureus* ทำให้เกิดโรคในอวัยวะต่างๆและเนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนของร่างกาย ที่พบบ่อยคือ ทำให้เกิดโรคฝีหนอง เช่น ฝีตามรูขุมขน ฝีฝักบัว กล้ามเนื้ออักเสบ และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เป็นต้น และยังทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษด้วย

2.4.1.4 *Escherichia coli* จัดอยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง มีขนาด 0.3 – 1.0 x 1.0 – 6.1 ไมโครเมตร *E. coli* สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสได้ เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา ปกติเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ โดยไม่ทำให้เกิดโรค แต่มีบางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรค ได้แก่

- Enterovasive *E. coli* สามารถบุกรุกเซลล์เยื่อบุของลำไส้ใหญ่ทำให้เกิดอาการคล้ายโรคบิด คือท้องร่วง ถ่ายเป็นมูกเลือด เป็นตะคริวและมีไข้
- Enterotoxigenic *E.coli* ทำให้เกิดอาการท้องร่วงในเด็กทารกตามสถานรับเลี้ยงเด็ก ส่วนในผู้ใหญ่จะทำให้เกิดอาการอาเจียน
- Enteropathogenic *E.coli* ทำให้เกิดท้องร่วงในทารกแรกคลอด
- Enterohemorrhagic *E.coli* ทำให้เกิดการตกเลือดในลำไส้ใหญ่
- Enteroautoagglutinae E.coli ทำให้เกิดท้องร่วงในเด็กอายุต่ำกว่า 6 เดือน

2.4.1.5 *Pseudomonas aeruginosa* จัดอยู่ในวงศ์ *Pseudomonadaceae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งตรง หรือโค้งเล็กน้อย เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล เช่น โรคติดเชื้อจากบาดแผล โรคติดเชื้อของตา

2.4.1.6 *Salmonella typhimurium* จัดอยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคน ซึ่งจะพบได้ 3 ลักษณะ คือ Enteric fever, Gastroenteritis และ Septicemia อาการเป็นพิษจะเกิดจากรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนอยู่ ระยะฝักตัวของโรค 8 – 48 ชั่วโมง อาการที่เกิดขึ้นคือ คลื่นไส้ ไข้หนาวสั่น อุจจาระร่วง ในรายไม่รุนแรงอาการจะหายภายใน 2-4 วัน แต่ยังตรวจพบเชื้อในลำไส้ของผู้ป่วยอีกนานนับเดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 ยีสต์ (Yeast)

2.4.2.1 *Candida albicans* เป็นยีสต์ซึ่งปกติพบในปาก ลำไส้ และช่องคลอดของคน ทำให้เกิดโรคที่รวมเรียกว่าแคนดิเดียซีส (Candidiasis) บริเวณที่พบว่ามีการติดเชื้อชนิดนี้มากที่สุด คือช่องคลอด นอกจากนั้นอาจทำให้เกิดการติดเชื้อที่ช่องปาก เป็นฝ้าขาวในปาก หรือ ผื่นแดง มักจะเกิดที่เพดานปากและลิ้น

2.4.2.2 *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ในวงศ์ *Saccharomycetaceae* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดประมาณ 20-50 ไมโครเมตร สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งจะเจริญเป็นโคโลนี ลักษณะกลม นูนเยิ้ม เชื้อจะสร้าง Ascospore และอาจสร้าง Pseudohyphae แต่ไม่มีผนังกั้นเส้นใย *S. cerevisiae* สามารถหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรักโทส ซูโครส และมอลโทสได้ โดยเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และแอลกอฮอล์ สามารถแยกเชื้อได้จากอุจจาระของคน ดิน และผลไม้ โดยทั่วไปเชื้อนี้จะไม่ก่อโรค และจึงนำเชื้อนี้มาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเซลล์ยีสต์ขนมปัง ผลิตภัณฑ์ขนมปัง เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ได้แก่ ไวน์ เบียร์ สุรา และเอทิลแอลกอฮอล์

2.4.3 ราที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (Filamentous fungi)

2.4.3.1 *Aspergillus flavus* จัดอยู่ในวงศ์ *Trichocomaceae* เชื้อราชนิดนี้มักจะพบปนเปื้อนอยู่ในผลิตผลทางเกษตรและอาหาร เช่น ข้าวที่เก็บไว้ในที่อับชื้นนานๆ เกิดราขึ้นเมล็ดเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หรือถั่วลิสงบางฝักมีราขึ้นที่เมล็ดใน สารพิษที่สำคัญ ได้แก่ อะฟลาท็อกซิน (Aflatoxin) ทำให้เกิดโรคอะฟลาท็อกซิโคซิส (Aflatoxicosis) ในประเทศอังกฤษ เมื่อพ.ศ.2503 เกิดมีโรคระบาดของสัตว์เลี้ยง เนื่องจากสัตว์กินถั่วลิสงที่ซื้อจากประเทศบราซิลและถั่วลิสงจำนวนนั้นมีเชื้อรา *Aspergillus flavus* ปนเปื้อน ปลดปล่อยอะฟลาท็อกซินออกมา เป็นเหตุให้ลูกไก่งวง ลูกเป็ด ลูกสุกร และลูกโค ล้มตายเป็นจำนวนมาก

2.4.3.2 *Aspergillus fumigatus* จัดอยู่ในวงศ์ *Trichocomaceae* เชื้อราชนิดนี้จะก่อโรคโดยการที่หายใจเอาสปอร์เข้าไปในปอดทำให้เกิดติดเชื้อที่ปอด แม้ว่าสปอร์ของราชนิดนี้จะมีอยู่ในอากาศ แต่คนปกติเมื่อหายใจได้รับเชื้อรานี้มักจะไม่เกิดโรค แต่สำหรับคนที่มีภูมิคุ้มกันไม่ดี เช่น ได้รับเคมีบำบัด ได้รับยาสเตียรอยด์ ผู้ป่วยมะเร็ง หรือผู้ที่ใส่เครื่องช่วยหายใจหรือโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง เมื่อได้รับเชื้อนี้จะทำให้เกิดการติดเชื้อที่ปอด ผู้ที่ติดเชื้อนี้มักจะเสียชีวิตเนื่องจากภูมิคุ้มกันไม่ดี

2.4.3.3 *Aspergillus niger* จัดอยู่ในวงศ์ *Trichocomaceae* ปกติแล้วจะใช้ราชนิดนี้ในการผลิตกรดมะนาวหรือกรดซิตริก หรือนำมาผลิตเอนไซม์บางชนิด เช่น เอนไซม์อะไมเลส และเป็นจุลินทรีย์ที่มักพบปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการทั่วไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3.4 *Rhizopus oligosporus* จัดอยู่ในวงศ์ *Mucoraceae* เชื้อราชนิดนี้นิยมนำมาใช้ผลิตเทมเป้ ซึ่งเป็นการนำถั่วชนิดต่างๆมานึ่งและใส่เชื้อชนิดนี้ลงไปหมักนาน 18 – 24 ชม. ก็จะได้ผลิตภัณฑ์เทมเป้ซึ่งเป็นอาหารหมักชนิดหนึ่ง

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.5.1 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของไพล

นิยดา (2522) ศึกษาคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ที่แยกได้จากไพล เพื่อเป็นแนวทางที่จะนำมาใช้บำบัดอาการหอบหืด พบว่าสาร D (Zc-3) มีคุณสมบัติที่น่าสนใจคือ สามารถทำให้กล้ามเนื้อเรียบบริเวณลำไส้เล็กส่วนปลายของหนูตะเภาคลายตัว และสามารถต้านฤทธิ์ของฮีสตามีน อะเซททิลโคลีน นิโคทีน และเซโรโทนิน ที่มีฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อนี้ นอกจากนี้ยังสามารถต้านฤทธิ์ของฮีสตามีนที่มีต่อหลอดลมหนูตะเภา แต่สาร D (Zc-3) มีข้อเสียคือ เมื่อให้ขนาดสูงๆจะยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาว ที่เกิดจากการกระตุ้นเส้นประสาทฟรีนิค และยังกดอำนาจการหดตัวอัตโนมัติของกล้ามเนื้อหัวใจของหนูตะเภาได้ด้วย จากผลการทดลองแสดงว่า ไพลมีคุณสมบัติที่จะนำมาใช้เป็นยาบำบัดอาการหอบหืด หรือใช้บำบัดอาการปวดเกร็งของกล้ามเนื้อลำไส้ได้ เช่นเดียวกับยาอะมิโนฟีลีน (aminophylline)

Panthong และคณะ (1990) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดไพล 7 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน พบว่าสารสกัดไพลสามารถยับยั้งการอักเสบของอุ้งเท้าหนูซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดยการฉีดคาราจิแนนได้ร้อยละ 24.2 - 83.9 โดยสาร DMPBD ให้ฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด และมีฤทธิ์ในการแก้ไข้ แก้ปวดด้วย และผู้วิจัยให้ข้อเสนอแนะว่า กลไกการออกฤทธิ์คล้าย NSAID

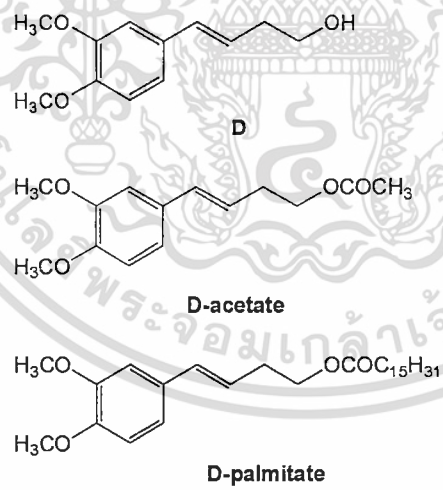
Yokihiro และคณะ (1991) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของไพล โดยใช้สารสกัดเหง้าไพลด้วยเมทานอล อีเธอร์ และเฮกเซน แล้วนำมาทำการทดสอบต้านการอักเสบของอุ้งเท้าหนูจากการฉีดคาราจิแนน และทดสอบต้านการปวดบวมเนื่องจากฉีดกรดอะซิติกเข้าเส้นเลือดหนู พบว่าในชั้นของสารสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ทั้งป้องกันการอักเสบและต้านการปวดบวม แล้วเมื่อนำสารสกัดนี้ไปสกัดต่อด้วยอีเธอร์ และเฮกเซน จะได้สาร (*E*)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene (DMPBD) ซึ่งผู้วิจัยสรุปว่าสารนี้ออกฤทธิ์เป็นยาป้องกันการอักเสบ และยาบรรเทาปวด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าลิงแสมที่ได้รับไพลขนาดต่ำมีการเจริญเติบโตเร็ว และมีจำนวนเม็ดเลือดแดงอัดแน่นสูงกว่ากลุ่มอื่น แต่ถ้าได้รับไพลขนาดสูงจะเกิดอาการเป็นพิษต่อตับอย่างเฉียบพลันและเติบโตช้า สุขภาพไม่แข็งแรง ตับเสียสมดุลในการสร้างโปรตีน แต่ร่างกายจะมีการปรับสภาพเป็นระยะๆ แล้วเซลล์ตับสามารถซ่อมแซมใหม่ได้ เมื่อเลิกรับประทาน

2.5.4 โครงสร้างของสารประกอบที่เคยค้นพบในไพล

เรณู (2530) จากการศึกษาทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ของสาร D, D-acetate และ D-palmitate แสดงดังรูป 2.5 ด้วยวิธี Intestinal loop technique ของหนูขาว พบว่า สาร D และ D-acetate ถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้ได้เร็วกว่าสาร D-palmitate มากและได้มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสาร D-acetate ในพลาสมาและ S-9 fraction ของหนูขาว พบว่าสาร D-acetate ถูกเปลี่ยนไปเป็นสาร D โดยแปรเป็นสัดส่วนกับเวลาที่ใช้ incubate ปริมาณสาร D และปริมาณโปรตีน โดยอัตราเร็วการเปลี่ยนแปลงที่พบใน S-9 fraction นั้นสูงกว่าในพลาสมาถึง 10 เท่า นอกจากสาร D จะถูกดูดซึมได้เร็วและขจัดออกจากร่างกายได้เร็วแล้ว ค่าครึ่งชีวิตของการขจัดออกจากร่างกายเมื่อศึกษาในหนูขาวและในลิงไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อป้อนยาลิงติดต่อกันนาน 28 วัน พบว่าค่าครึ่งชีวิตของการขจัดยา ออกจากร่างกายนานขึ้น



รูปที่ 2.5 แสดงสูตรโครงสร้างของสาร D, D-acetate และ D-palmitate

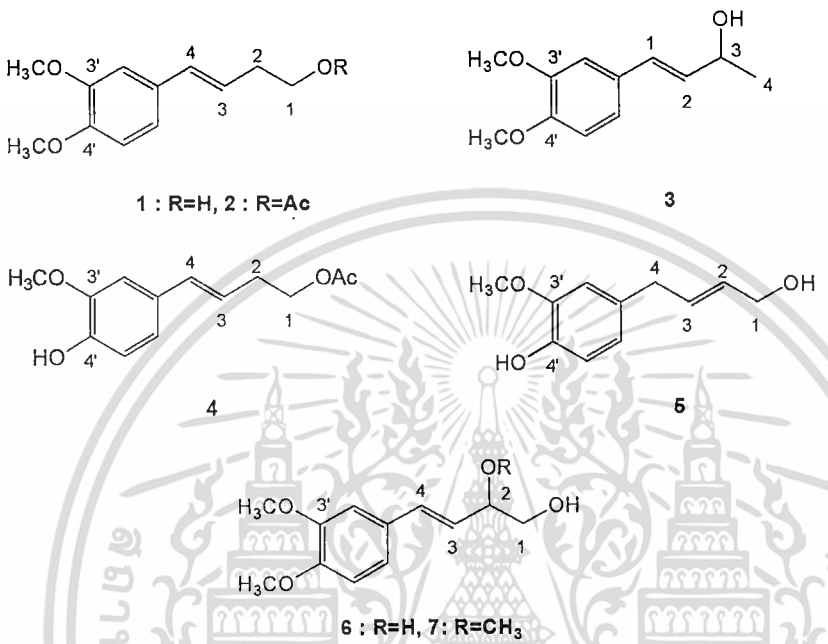
สาร D : (*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol

สาร D-acetate : (*E*)-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)but-3-en-l-yl acetate

สาร D-palmitate : (*E*)-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)but-3-en-l-yl palmitate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
64351

Masuda and Jitoe (1995) พบ Phenylbutenol monomers ใหม่ 4 ชนิด ที่สกัดได้จากส่วนเหง้าของไพล (*Zingiber cassumunar*) คือ (*E*)-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)but-3-en-l-yl acetate (*E*)-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)but-2-en-1-ol (*E*)-2-hydroxy-4-(3,4-dimethoxy phenyl)but-3-en-1-ol and (*E*)-2-methoxy-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-l-ol และพบ Phenyl butenol monomers อีก 3 ชนิดที่เคยพบมาแล้ว แสดงดังรูป 2.6



รูปที่ 2.6 แสดง **Phenylbutenol monomer** 7 ชนิดที่ค้นพบ

1. (*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol
2. (*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-l-yl
3. (*E*)-3-hydroxy-l-(3,4-dimethoxyphenyl)but-l-ene
4. (*E*)-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)but-3-en-l-yl acetate
5. (*E*)-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)but-2-en-l-ol
6. (*E*)-2-hydroxy-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol
7. (*E*)-2-methoxy-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol

2.5.5 ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชในวงศ์ *Zingiberaceae*

วนิดา (2542) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยและสารเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชัน เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใย 29 สายพันธุ์ และยีสต์ 27 สายพันธุ์รวมทั้งแบคทีเรีย 21 สายพันธุ์ พบว่าน้ำมันหอมระเหยแสดงฤทธิ์ยับยั้งราที่มีลักษณะเป็นเส้นใยได้ดีที่สุด และยับยั้งยีสต์จำพวก *Cryptococcus* ได้ดีกว่า *Candida* แต่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ไม่ดี เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุดจึงนำมาทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อได้ (MIC) โดยวิธี Broth dilution พบว่าฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของน้ำมันระเหยนั้นทำได้ดี (ค่า MIC 7.8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และดีกว่าสารสกัดหยาบ

Habsah และคณะ (2000) ได้สกัดสารจากพืชในวงศ์ *Zingiberaceae* 13 ชนิด โดยใช้ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์และคุณสมบัติในการเป็นสาร Antioxidant พบว่าสารสกัดในชั้นของเมทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ และยับยั้งเชื้อราได้เพียงชนิดเดียวคือ *Aspergillus ochraceous* (โดยมีค่า MID 15.6 ไมโครกรัมต่อแผ่นดิสก์) สารสกัดทั้งหมดมีคุณสมบัติเป็น Antioxidant เท่ากับหรือมากกว่า α-tocopherol

Martins และคณะ (2001) ได้สกัดสารจากพืชวงศ์ *Zingiberaceae* 3 ชนิด โดยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำ ขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) เป็นพืชชนิดหนึ่งในวงศ์นี้ ซึ่งเมื่อทำการศึกษาและสกัดน้ำมันหอมระเหยออกมาทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion แล้วพบว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้มีฤทธิ์ในการต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบที่นำมาใช้ในการทดสอบ รวมทั้งเชื้อยีสต์และเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใยได้ดี และดีกว่า กระวาน กับ ขมิ้นชัน

2.5.6 งานวิจัยทางด้านอื่น

ศิริภา (2534) ศึกษาผลทางไซโตเจนิติคของไพลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวในหลอดทดลอง ได้นำสารละลายไพลเข้มข้น 100 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร มาเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วศึกษาผลทางไซโตเจนิติค พบว่าอัตราการแบ่งเซลล์จะลดลงโดยเมื่อแช่เซลล์ไว้ในสารละลายไพลนานขึ้น ส่วนความผิดปกติของโครโมโซมก็จะมีความผิดปกติมากขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับสารละลายไพลเป็นเวลาเพิ่มขึ้น

สำอาง (2541) การทดสอบฤทธิ์ฆ่าหนอนกระทู้ผัก *(Spodoptera litura* Fabr.) ของพืชวงศ์ *Zingiberaceae* บางชนิดได้แก่ กระทือ 2 ใบ *(Amomum* sp.) ไพลดำ *(Zingiber ottensii)* และปุดสิงห์ *(Eletariopsis curtisii)* ศึกษาโดยนำส่วนของลำต้นใต้ดินและก้านมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เมทานอล ตามลำดับ แล้วทดสอบฤทธิ์ พบว่าฤทธิ์จากการกิน (Oral application) ให้ผลดีกว่าฤทธิ์จากการสัมผัสโดยการหยด (Topical application) และสารสกัดหยาบเฮกเซนของกระทือ 2 ใบ เท่านั้น มีฤทธิ์ในการฆ่าหนอนกระทู้ผักได้ค่อนข้างดี สารสกัดหยาบของลำต้นใต้ดินแสดง LC_{50} และ LC_{90} เท่ากับร้อยละ 1.19 และร้อยละ 3.48 ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดหยาบจากก้านแสดงฤทธิ์ในการฆ่าหนอนกระทู้ผักได้น้อยกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 แหล่งพืชสมุนไพรไพล

พืชสมุนไพรไพล ใช้ส่วนเหง้าของไพลนำมาจากจังหวัดฉะเชิงเทรา

3.2 จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ

3.2.1 แบคทีเรีย 6 สายพันธุ์

3.2.1.1 แบคทีเรียแกรมบวก

- *Bacillus cereus* TISTR 747
- *Bacillus subtilis* TISTR 025
- *Staphylococcus aureus* TISTR 746

3.2.1.2 แบคทีเรียแกรมลบ

- *Escherichia coli* TISTR 512
- *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781
- *Salmonella typhimurium* TISTR 292

3.2.2 เชื้อยีสต์ 2 สายพันธุ์

- *Candida albicans* TISTR 5779
- *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048

3.2.3 เชื้อรา 4 สายพันธุ์

- *Aspergillus flavus* TISTR 3366
- *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108
- *Aspergillus niger* TISTR 3089
- *Rhizopus oligosporus* TISTR 3150

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (MIRCEN)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ และสารเคมี

3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

3.3.1.1 อาหารแข็ง Potato dextrose agar (PDA)

3.3.1.2 อาหารแข็ง Mueller Hinton agar (MHA)

3.3.1.3 อาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB)

3.3.1.4 อาหารเหลว Mueller Hinton broth (MHB)

3.3.2 สารเคมี

3.3.2.1 เฮกเซน (Hexane)

3.3.2.2 เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate)

3.3.2.3 เมทานอล (Methanol)

3.3.2.4 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)

3.3.2.5 ทวีน 80 (Tween80)

3.3.2.6 แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnisium sulfate)

3.3.2.7 ซิลิกาเจล (Silicagel) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.04-0.06 และ 0.06-0.20 มิลลิเมตร

3.4 อุปกรณ์ และเครื่องแก้ว

3.4.1 อุปกรณ์

3.4.1.1 กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) บริษัท Olympus, UFX-DX

3.4.1.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Hirayama, Hiclave HV-50

3.4.1.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Hermle, Z383K

3.4.1.4 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow) บริษัท ISSCO, HS123

3.4.1.5 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) บริษัท Memmert, WB29

3.4.1.6 ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (Incubator) บริษัท Scientific promotion, Binder control

3.4.1.7 เครื่องผสมสาร (Vortex) บริษัท Scientific industries, G560E

3.4.1.8 เครื่องชั่ง (Balance) บริษัท Mettler, AG240

3.4.1.9 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) บริษัท Gallenkamp,

T490188

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.1.10 เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) บริษัท Buchi, R-200

3.4.1.11 แผ่นแม่เหล็กให้ความร้อน (Stirring heating plate) บริษัท IKA-Labortechnik, KMO2

3.4.1.12 เครื่องอ่านค่า Microtiter plate reader บริษัท Helsinki, iEMS ReaderMF

3.4.1.13 แผ่น disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

3.4.1.14 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.4.1.15 แผ่น TLC (Thin Layer Chromatography)

3.4.1.16 ชุดวัดความขุ่น McFarland Standard เบอร์ 5.0

3.4.1.17 เครื่องนับเซลล์ (Haemacytometer)

3.4.1.18 ถาดเพาะเชื้อแบบ 96 หลุม (Microtiter plate)

3.4.1.19 ไม้สำลีปราศจากเชื้อ (Sterile cotton swab)

3.4.1.20 เวอร์เนีย คาลิเปอร์ (Venire caliper)

3.4.1.21 ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)

3.4.1.22 เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)

3.4.1.23 ปากคีบ (Forceps)

3.4.1.24 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.4.1.25 เครื่องสเปกโทรเมตรีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR)

3.4.1.26 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS)

3.4.2 เครื่องแก้ว

3.4.2.1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม.

3.4.2.2 บีกเกอร์

3.4.2.3 กระบอกตวง

3.4.2.4 ขวดรูปชมพู่

3.4.2.5 หลอดทดลอง

3.4.2.6 กรวยกรองแก้ว

3.4.2.7 แท่งแก้วรูปตัววี

3.4.2.8 แท่งแก้วคน

3.4.2.9 ขวดโหล

3.4.2.10 ขวดก้นกลม

3.4.2.11 คอลัมน์ (Column)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.5.1 ขั้นตอนการสกัดสารจากไพล

นำเหง้าของไพลล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไพลที่หั่นแล้วมาอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันหรือจนแห้ง นำไพลที่อบแล้วมาชั่งน้ำหนักให้ได้ 2 กิโลกรัม นำไปห่อด้วยผ้าขาวบางจากนั้นแช่ด้วยสารอินทรีย์ 3 ลำดับ ลำดับแรกแช่ในตัวทำละลายเฮกเซนปริมาตร 6 ลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ขยับผ้าขาวบางที่ห่อไพลขึ้นลงทุกวันเพื่อให้ตัวทำละลายอินทรีย์สัมผัสกับไพลได้อย่างทั่วถึง หลังหนึ่งสัปดาห์นำสารที่สกัดได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนจนสารที่ได้มีลักษณะเหลวหนืด เรียกสารส่วนนี้ว่าสารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซน แยกเก็บสารไว้ในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อมานำส่วนกากไพลที่ห่อผ้าขาวบางไปผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปแช่ในสารอินทรีย์ลำดับต่อมา คือ ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วทำทุกขั้นตอนเหมือนวิธีสกัดสารในตัวทำละลายเฮกเซนจนได้สารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท สุดท้ายนำห่อผ้าขาวบางที่ใส่กากไพลมาแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ลำดับที่ 3 คือ เมทานอล ทำทุกขั้นตอนเหมือนวิธีที่ใช้ในการสกัดด้วยทำละลายเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท จนได้สารสกัดหยาบไพลในชั้นเมทานอล เมื่อสกัดสารครบจะได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 3 ชนิด คือ

3.5.1.1 สารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซน

3.5.1.2 สารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท

3.5.1.3 สารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายเมทานอล

3.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัด (ใช้ตัวเจือจางสารสกัดไพลชนิดต่างๆ) โดยวิธี Disc diffusion

3.5.2.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย ถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลว MHB นำมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบประมาณ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 จากนั้นละลายตะกอนด้วยสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 แล้วนำสารแขวนลอยเซลล์ (cell suspension) มาเทียบความขุ่นให้ได้เท่ากับความขุ่นของ McFarland standard No.5 จะได้ปริมาณความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางอีก 10 เท่า โดยดูดสารละลายดังกล่าว 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมเชื้อยีสต์ ถ่ายเชื้อยีสต์ลงในอาหารเหลว PDB นำมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบประมาณ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 จากนั้นละลายตะกอนด้วยสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 แล้วนำสารแขวนลอยเซลล์ (Cell suspension) มาเทียบความขุ่นให้ได้เท่ากับความขุ่นของ McFarland standard No.5 จะได้ปริมาณความความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางอีก 10 เท่า โดยดูดสารละลายดังกล่าว 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้ความความหนาแน่นของเซลล์ยีสต์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

การเตรียมเชื้อรา ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเส้นใยรามาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ในหลอดทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเทสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 ลงไปในหลอดที่เพาะเลี้ยง จะได้สารแขวนลอยสปอร์ (Spore suspension) ถ่ายสารแขวนลอยที่ได้ลงในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปวัดปริมาณสปอร์ของเชื้อราด้วยเครื่องนับเซลล์ (Haemacytometer) แล้วปรับปริมาณสปอร์ให้ลดลงจนเท่ากับปริมาณ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1

3.5.2.2 วิธีการเตรียมสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

ละลายสารสกัดจากไพลในชั้นตัวทำละลายต่างๆด้วยสารทำละลายต่างๆดังนี้ DMSO ร้อยละ 10 Tween 80 ร้อยละ 5 และ Tween 80 ร้อยละ 1 โดยเจือจางให้สารสกัดมีความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัด 20 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นดิสค์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร สำหรับแผ่นดิสค์ชุดควบคุมจะใช้ DMSO ร้อยละ 10 Tween 80 ร้อยละ 5 และ Tween 80 ร้อยละ 1 หยดลงบนแผ่นดิสค์แทนสารสกัด

3.5.2.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

เตรียมอาหารแข็ง MHA และอาหารแข็ง PDA ในจานเพาะเลี้ยง ใช้ไม้ปลายพันสำลี (Cotton swab) ชุบสารแขวนลอยแบคทีเรีย ยีสต์ และสปอร์รา ตามข้อ 3.5.2.1 มาป้ายให้ทั่วอาหารแข็ง MHA (สำหรับแบคทีเรีย) และอาหารแข็ง PDA (สำหรับยีสต์ และรา) วางแผ่นดิสค์ที่หยดสารสกัด และแผ่นดิสค์ชุดควบคุมลงบนอาหารที่ป้ายเชื้อ (swab) และนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย ส่วนของยีสต์ และราบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยการทดสอบจะทำ 3 ซ้ำ (Murray และคณะ. 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.3 การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นตัวทำละลายต่างๆ ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)

นำสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายเฮกเซนมาใส่ขวด vial แล้วละลายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ใช้แคปิลารีแก้วทำการ spot สารสกัดหยาบที่ละลายแล้วลงผนแผ่น TLC ขนาด 2 x 5 เซนติเมตร เตรียม TLC tank ซึ่งมีสัดส่วนการละลายของสารเฮกเซนกับเอทิลอะซิเตทในอัตราส่วน 90 : 10 จากนั้นจุ่มแผ่น TLC ลงบนสารละลายอินทรีย์ภายใน tank แล้วปิดด้วยแผ่นกระจก ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่ไปถึงระดับ Solvent front ที่กำหนด ดูผลที่เกิดขึ้นว่าสารที่แยกได้เป็นอย่างไร ถ้าสารสามารถแยกเห็นเป็นจุดชัดเจนแสดงว่าอัตราส่วนที่ผสมใน TLC tank เป็นระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งถ้ายังไม่เหมาะสมก็สามารถเพิ่มขั้วของระบบโดยเพิ่มปริมาณตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทจาก 10% เป็น 20% และ 30% เรื่อยๆ จนได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม จากนั้นนำแผ่น TLC ที่ได้ไปทดสอบการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร แล้วนำแผ่น TLC ไปย้อมด้วย Developing solvent ให้ทั่วแผ่น นำไปอุ่นบนแผ่นแม่เหล็กให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนสีของจุดที่เกิดขึ้น ผลที่ได้นำไปใช้เป็นระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี และหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมกับตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทและเมทานอล

3.5.4 การแยกสารสกัดหยาบโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟี (Column Chromatography) ครั้งที่ 1

3.5.4.1 ขั้นตอนการเตรียมคอลัมน์

นำคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 นิ้วครึ่ง มาอุดปลายด้านตีบด้วยสำลี จากนั้น Pack column โดยใช้เฮกเซนผสมกับผงซิลิกา (ผงซิลิกาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.04-0.06 มิลลิเมตร) คนสารผสมอย่าให้ผงซิลิกานอนก้น แล้วเทลงไปในคอลัมน์แก้วอย่างช้าๆ โดยใช้กรวยช่วยเทจนได้คอลัมน์สูงประมาณ 30 เซนติเมตร ปล่อยเฮกเซนให้ไหลออกจากคอลัมน์ช้าๆ แต่อย่าให้คอลัมน์แห้ง คอยเติมเฮกเซนอยู่ตลอด (คอลัมน์จะชุ่มด้วยตัวทำละลายตลอดเวลา) เมื่อได้ปริมาณซิลิกาตามต้องการแล้วทำการปรับผิวซิลิกาให้เรียบไม่ให้มีรอยแตกหรือฟองอากาศ จากนั้นเติมแมกนีเซียมซัลเฟตทับชั้นซิลิกาให้สูงประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วเติมเฮกเซนไปอีกเล็กน้อย

3.5.4.2 การเตรียมตัวอย่างสารสกัด

แบ่งสารสกัดหยาบมา 100 กรัม เติมผงซิลิกาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.06-0.20 มิลลิเมตรลงไป ซิลิกาจะดูดสารสกัดเข้าไปจนอิ่มตัวจนเริ่มหนืด จากนั้นใช้ลมร้อนเป่าข้างภาชนะที่บรรจุจนสารข้างในแห้ง จะได้ตัวอย่างสารสกัดอยู่ในรูปผงซิลิกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4.3 การแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี

นำตัวอย่างสารสกัดจากข้อ 3.5.4.2 มาใส่ในคอลัมน์ แล้วเติมเฮกเซนเพิ่มอีกประมาณ 200 มิลลิลิตร จากนั้นปล่อยตัวทำละลายผ่านสารสกัดผ่านคอลัมน์ออกมาอย่างช้าๆ โดยระวังอย่าให้ตัวทำละลายหมด เติมเฮกเซนเข้าไปอีก 300 มิลลิลิตร แล้วทำการปล่อยตัวทำละลายผ่านคอลัมน์ออกมาอีก แต่ส่วนนี้จะทำการเก็บสารที่ออกจากคอลัมน์แยกเป็นขวดๆ ขวดละประมาณ 30 มิลลิลิตร จากนั้นเขียนกำกับข้างขวดโดยเรียงลำดับจาก 1, 2, 3, ... ไปเรื่อยๆ ต่อมานำขวดสารที่ 1, 3, 5, 7, ... มาทดสอบผลโดยใช้แผ่น TLC (Tin Layer Chromatography) เทียบกับสารสกัดหยาบ เมื่อดูผลทดสอบแล้วจะเห็นจุดของสารบนแผ่น TLC แต่ละขวดนำไปเทียบตำแหน่งกับจุดของสารสกัดหยาบ โดยจุดของสารที่มีขั้วน้อยจะออกมาก่อน แล้วเมื่อจุดแรกเริ่มจางให้ทำการเปลี่ยนขั้วสารตัวทำละลายที่เติมจากเฮกเซน 100 % (0% เอทิลอะซิเตท) เปลี่ยนเป็น 3% เอทิลอะซิเตท (เอทิลอะซิเตท 3% ต่อเฮกเซน 97%) จากนั้นจุดต่อมาที่มีขั้วมากกว่าจะปรากฏตามมา ให้เปลี่ยนขั้วของตัวทำละลายเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จาก 3% เป็น 6% 9% 12% ... จนสุดท้าย เมื่อจุดสารที่มีขั้วมากที่สุดจางลง จึงใช้ 100% เอทิลอะซิเตทชะส่วนที่เหลือออกมาให้หมด ดูรูปแบบจุดบนแผ่น TLC แล้วนำขวดที่มีรูปแบบจุดสารคล้ายกันมาผสมรวมกัน ใส่ในบีกเกอร์ขนาดใหญ่ จากนั้นนำของเหลวในแต่ละบีกเกอร์มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน แล้วจะได้สารสกัดส่วนต่างๆที่มีขั้วของสารใกล้เคียงกัน จากนั้นนำสารที่สกัดได้แต่ละส่วนไปทดสอบกับจุลินทรีย์อีกครั้ง

3.5.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดไพลในชั้นตัวทำละลายต่างๆ หลังจากแยกชั้นด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 1 โดยวิธี Disc diffusion

หลังจากแยกสารสกัดไพลในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 1 นำสารสกัดแต่ละส่วนมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.5.2 วัดขนาดวงใสของการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ คัดเลือกส่วนของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีมาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

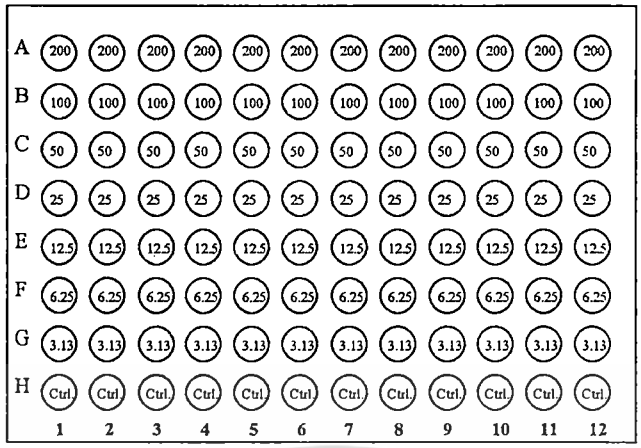
การทดลองในหัวข้อ 3.5.2 และ 3.5.5 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized design (CRD) ทรีทเมนต์ละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของดันแคน (Duncan's New Multiple Range Test)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.6 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดไพล โดยหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) โดยวิธี Broth dilution

นำสารสกัดไพลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ซึ่งทำให้เกิดวงใสเมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion มาหาค่า MIC โดยวิธี Broth dilution การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเช่นเดียวกับข้อ 3.5.2.1 แล้วนำ Microtiter plate แบบ 96 หลุม มาเติมอาหารเหลว MHB หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารสกัดไพลในชั้นตัวทำละลายต่างๆโดยเจือจางความเข้มข้นของสารสกัดในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า จาก 200 เป็น 100 50 25 ... 3.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีตัวควบคุม (Control) คือ อาหารเหลวซึ่งไม่มีสารสกัด จากนั้นนำไปหยดลงหลุมหลุมละ 45 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เชื้อแบคทีเรียลงไปในหลุม หลุมละ 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าความขุ่น (OD : Optical density) ของของเหลว ด้วยเครื่อง Microtiter plate reader โดยเชื้อแบคทีเรียวัดค่าความขุ่นที่ 620 นาโนเมตร และเชื้อราวัดค่าความขุ่นที่ 540 นาโนเมตร บันทึกความขุ่นของของเหลวในแต่ละหลุม (มาลิน. 2532) จากนั้นนำ Microtiter plate ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าความขุ่นของของเหลวอีกครั้งหนึ่ง (ความเข้มข้นของสารสกัดที่เติมในแต่ละหลุมแสดงดังรูปที่ 3.1) จากนั้นนำผลมาเปรียบเทียบกันระหว่างก่อนบ่มเชื้อ กับหลังบ่มเชื้อ สารสกัดที่ระดับความเข้มข้นซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ จะมีค่าความขุ่นของของเหลวหลังบ่มต่ำกว่าหรือเท่ากับค่าความขุ่นของของเหลวก่อนบ่ม ถ้าค่าความขุ่นของของเหลวหลังบ่มสูงกว่าแสดงว่าเชื้อมีการเจริญเพราะสารสกัดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์นั้นได้ทั้งหมด โดยระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้จะนำมาบันทึกเป็นค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentration)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดที่เติมลงในหลุม Microtiter plate หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1-12 คือ สารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายต่างๆ

A-H คือ ความเข้มข้นของสารสกัดที่เจือจางลดลงทีละครึ่งหนึ่ง

และ Ctrl. (Control) คือ อาหารเหลวที่ไม่ใส่สารสกัด

3.5.7 การแยกสารสกัดจากไพลโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 2

นำสารสกัดจากไพลจากข้อ 3.5.6 มาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 2 โดยใช้คอลัมน์ขนาดเล็กลง (คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว) เพื่อทำให้ได้สารสกัดที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น

3.5.8 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดไพล หลังจากนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 2 หาค่า MIC โดยวิธี Broth dilution

นำสารสกัดไพลที่แยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 2 มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ ด้วยวิธี Broth dilution

3.5.9 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่แยกได้

นำสารสกัดไพลที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีมาตรวจสอบเพื่อหาวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีและมวลโมเลกุลของสาร โดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) และเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟฟี – แมสสเปกโตเมทรี (GC-MS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 สารสกัดหยาบที่ได้จากไพล

นำไพลมาสกัดโดยผ่านขั้นตอนการสกัดเย็นด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ เมื่อนำมาชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบต่อน้ำหนักแห้งของพืชที่ใช้ พบว่าร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้มีค่าตั้งแต่ร้อยละ 1.87 ถึงร้อยละ 6.21 โดยสารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนมีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลืองเข้ม ส่วนสารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีลักษณะเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้มมีเกล็ดของแข็งเล็กน้อย และสารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายเมทานอล มีลักษณะเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะของสารสกัดหยาบไพล และร้อยละของสารที่สกัดได้

ชั้นของตัวทำละลาย	สีของสารสกัด	ลักษณะ	ร้อยละของสารสกัดหยาบ
เฮกเซน	สีเหลืองเข้ม	เหลวใส	2.89
เอทิลอะซิเตท	สีน้ำตาลเข้ม	เหลวหนืดมีเกล็ด	1.87
เมทานอล	สีน้ำตาลดำ	เหลวหนืด	6.21

4.2 การทดสอบหาตัวเจือจางสารสกัดหยาบไพล

สารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล เมื่อเจือจางที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย tween80 ร้อยละ 1 tween80 ร้อยละ 5 และ Dimethyl sulfoxide (DMSO) ร้อยละ10 พบว่าสารสกัดไพลเจือจางได้ดีที่สุดใน tween80 ร้อยละ 5 รองลงมาคือ tween80 ร้อยละ 1 และ DMSO ร้อยละ10 ตามลำดับ

4.3 ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากไพลโดยวิธี Disc diffusion

เมื่อนำแผ่น disc ที่หยดสารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อแผ่น disc มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดจากไพล สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบได้ดี ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมีค่าอยู่ในช่วง 6.53 – 21.10 มิลลิเมตร ขณะที่แผ่น disc ควบคุมซึ่งบรรจุสารเจือจาง DMSO ร้อยละ 10 tween 80 ร้อยละ 5 และ tween 80 ร้อยละ 1 ไม่ทำให้เกิดวงใส ดัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงในรูปที่ 4.1 – 4.12 สารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซน ซึ่งละลายใน tween 80 ร้อยละ 5 สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีคือ *Aspergillus flavus* *A.fumigatus* *A.niger* และ *Rhizopus oligosporus* โดยทำให้มีขนาดวงใสอยู่ในช่วง 7.87– 19.27 มิลลิเมตร แต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ได้น้อย

สารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทที่เจือจางใน tween 80 ร้อยละ 5 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ดี ให้ผลยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* ได้ดีที่สุด ทำให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเท่ากับ 21.10 มิลลิเมตร รวมทั้งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา แต่ไม่ยับยั้งเชื้อยีสต์

สารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเมทานอลซึ่งเจือจางใน tween80 ร้อยละ 5 สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะ *Bacillus cereus* สารสกัดจากไพลในชั้นเมทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้ดีที่สุด และทำให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเท่ากับ 17.30 มิลลิเมตร แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์และรา ยกเว้น *Rhizopus oligosporus*

เมื่อนำผลไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยเปรียบเทียบสารเจือจางทั้ง 3 ตัว คือ tween 80 ร้อยละ 1 tween 80 ร้อยละ 5 และ DMSO ร้อยละ 10 พบว่าสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายทั้ง 3 ตัวทำละลาย (เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล) ที่เจือจางด้วย tween 80 ร้อยละ 5 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี Disc diffusion ได้มากกว่าการใช้ tween 80 ร้อยละ 1 และ DMSO ร้อยละ 10 และมีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงผลการทดสอบดังตารางที่ 4.3 – 4.5

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Habsah และคณะ (2000) ได้ศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์และฤทธิ์ในการป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันจากสารสกัดของพืชสกุล Zingiberaceae 13 ชนิด สารสกัดจากไพลโดยวิธีไดคลอโรมีเทนจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าสารสกัดจากไพลโดยใช้เมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายต่างๆ โดยวิธี **Disc diffusion** และเปรียบเทียบการเจือจางสารสกัดไพลด้วย 10%DMSO 5%tween80 และ 1%tween80

สารสกัด		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (mm. ± SD.)											
		B.cereus	*B.subtilis*	*S.aureus*	*E.coli*	*P.aeruginosa*	*S.typhimurium*	*C.albican*	*S.cerevisiae*	*A.flavus*	*A.fumigatus*	*A.niger*	*R.oligosporus*
Hexane	10%DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	7.77±0.64	8.93±1.27	10.70±1.95	7.90±0.30
	5%tween80	6.83±0.12	-	7.33±0.12	-	-	-		-	7.87±0.64	16.63±0.75	15.63±0.45	19.27±0.55
	1%tween80	-	-	-	-	-	-	10.47±0.29	-	10.23±0.93	19.20±0.92	11.23±0.99	10.50±0.96
Ethyl acetate	10%DMSO	14.03±1.76	10.37±0.12	7.73±0.40	7.36±0.42	10.20±0.40	10.70±0.06	-	-	-	-	-	9.00±0.62
	5%tween80	21.10±0.20	11.17±0.15	8.93±0.61	8.06±0.35	11.50±1.20	11.23±0.51	-	-	-	6.53±0.12	10.83±1.69	9.00±0.10
	1%tween80	19.33±0.70	12.07±1.85	-	7.30±0.70	8.93±0.91	9.60±0.20	7.70±0.96	-	-	-	9.40±0.82	10.40±0.26
Methanol	10%DMSO	11.83±1.43	11.26±0.75	16.53±0.91	7.83±0.12	7.83±0.78	10.70±0.60	-	-	-	-	-	9.03±0.38
	5%tween80	17.30±1.30	9.97±1.36	9.83±0.80	12.87±0.06	11.30±0.26	9.86±0.15	-	-	-	-	-	12.17±0.76
	1%tween80	15.17±1.11	9.40±0.89	13.90±1.60	8.70±0.85	6.90±0.66	9.07±0.67	-	-	-	-	-	7.63±0.15

หมายเหตุ สารสกัดไพลละลายใน DMSO ร้อยละ 10 tween80 ร้อยละ 5 และ tween80 ร้อยละ 1 , ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ 10 มิลลิกรัมต่อแผ่น disc

แผ่น disc มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

- : ไม่เกิดวงใสจากการต้านจุลินทรีย์ (clear zone)

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดหยาบไพลในชั้นของเฮกเซน โดยวิธี Disc diffusion และเปรียบเทียบการเจือจางสารสกัดไพลด้วย DMSO ร้อยละ 10 tween80 ร้อยละ 5 และ tween80 ร้อยละ 1

สารสกัด		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)											
		B.cereus	*B.subtilis*	*S.aureus*	*E.coli*	*P.aeruginosa*	*S.typhimurium*	*C.albican*	*S.cerevisiae*	*A.flavus*	*A.fumigatus*	*A.niger*	*R.oligosporus*
Hexane	10%DMSO	6.00^{b}	6.00^{a}	6.00^{b}	6.00^{a}	6.00^{a}	6.00^{a}	6.00^{b}	6.00^{a}	7.77^{b}	8.93^{c}	10.71^{b}	7.90^{c}
	5%tween80	6.83^{a}	6.00^{a}	7.33^{a}	6.00^{a}	6.00^{a}	6.00^{a}	6.00^{b}	6.00^{a}	7.87^{b}	16.63^{b}	15.63^{a}	19.27^{a}
	1%tween80	6.00^{b}	6.00^{a}	6.00^{b}	6.00^{a}	6.00^{a}	6.00^{a}	10.47^{a}	6.00^{a}	10.23^{a}	19.26^{a}	11.23^{b}	10.50^{b}

หมายเหตุ สารสกัดไพลละลายใน DMSO ร้อยละ 10 tween80 ร้อยละ 5 และ tween80 ร้อยละ 1, ใช้ปริมาณของสารสกัด 10 มิลลิกรัมต่อแผ่น disc
แผ่น disc มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดหยาบไพลในชั้นของเอทิลอะซิเตท โดยวิธี Disc diffusion และเปรียบเทียบการเจือจางสารสกัดไพลด้วย DMSO ร้อยละ 10 tween80 ร้อยละ 5 และ tween80 ร้อยละ 1

สารสกัด		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)											
		B.cereus	*B.subtilis*	*S.aureus*	*E. coli*	*P.aeruginosa*	*S.typhimurium*	*C.albican*	*S.cerevisiae*	*A.flavus*	*A.fumigatus*	*A. niger*	*R.oligosporus*
Ethyl acetate	10%DMSO	14.03^{b}	10.37^{a}	7.73^{b}	7.36^{a}	10.20^{ab}	10.07^{b}	6.00^{b}	6.00^{a}	6.00^{a}	6.00^{a}	6.00^{b}	9.00^{b}
	5%tween80	21.10^{a}	11.17^{a}	8.93^{a}	8.06^{a}	11.50^{a}	11.23^{a}	7.70^{a}	6.00^{a}	6.00^{a}	6.53^{a}	10.83^{a}	9.00^{b}
	1%tween80	19.33^{a}	12.07^{a}	6.00^{b}	7.30^{a}	8.93^{b}	9.60^{b}	6.00^{b}	6.00^{a}	6.00^{a}	6.00^{a}	9.40^{a}	10.40^{a}

หมายเหตุ สารสกัดไพลละลายใน DMSO ร้อยละ 10 tween80 ร้อยละ 5 และ tween80 ร้อยละ 1, ใช้ปริมาณของสารสกัด 10 มิลลิกรัมต่อแผ่น disc
แผ่น disc มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดหยาบไพลในชั้นของเมทานอล โดยวิธี Disc diffusion และเปรียบเทียบการเจือจางสารสกัดไพลด้วย DMSO ร้อยละ 10 tween80 ร้อยละ 5 และ tween80 ร้อยละ 1

สารสกัด		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)											
		B.cereus	*B.subtilis*	*S.aureus*	*E.coli*	*P.aeruginosa*	*S.typhimurium*	*C.albican*	*S.cerevisiae*	*A.flavus*	*A.fumigatus*	*A.niger*	*R.oligosporus*
Methanol	10%DMSO	11.83^{b}	11.26^{a}	16.53^{a}	7.63^{c}	7.83^{b}	10.70^{a}	6.00^{a}	6.00^{a}	6.00^{a}	6.00^{a}	6.00^{a}	9.03^{b}
	5%tween80	17.30^{a}	9.97^{a}	9.83^{c}	12.87^{a}	11.30^{a}	9.86^{ab}	6.00^{a}	6.00^{a}	6.00^{a}	6.00^{a}	6.00^{a}	12.17^{a}
	1%tween80	15.17^{a}	9.40^{a}	13.90^{b}	8.70^{b}	6.90^{b}	9.07^{b}	6.00^{a}	6.00^{a}	6.00^{a}	6.00^{a}	6.00^{a}	7.63^{c}

หมายเหตุ สารสกัดไพลละลายใน DMSO ร้อยละ 10 tween80 ร้อยละ 5 และ tween80 ร้อยละ 1, ใช้ปริมาณของสารสกัด 10 มิลลิกรัมต่อแผ่น disc
แผ่น disc มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.4 การศึกษาหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบในชั้นต่างๆ

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากชั้นต่างๆมาทำการ spot ลงบนแผ่น TLC ย้อมด้วย Developing solvent ศึกษาอัตราส่วนของระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงสัดส่วนของระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบไพล

สารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลาย	ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม
เฮกเซน	30% เอทิลอะซิเตท 70% เฮกเซน
เอทิลอะซิเตท	40% เอทิลอะซิเตท 60% เฮกเซน
เมทานอล	60% เอทิลอะซิเตท 40% เฮกเซน

4.5 การแยกสารสกัดหยาบไพลโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 1

การแยกสารสกัดจากไพลออกเป็นส่วนโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟี จากการทดลองพบว่าเมื่อนำสารสกัดจากไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซน ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และตัวทำละลายเมทานอล มาแยกออกเป็นส่วน ซึ่งสารสกัดไพลในชั้นตัวทำละลายเฮกเซนสามารถแยกสารออกได้เป็น 7 ส่วน สารสกัดไพลในชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทสามารถแยกได้เป็น 7 ส่วน และสารสกัดไพลในชั้นตัวทำละลายเมทานอลสามารถแยกได้เป็น 5 ส่วน ซึ่งแต่ละส่วนของสารสกัดมีลักษณะ และปริมาณสารที่แยกออกมาแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงลักษณะของสารสกัดไพลหลังการแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 1 และปริมาณของสารที่แยกได้

สารสกัดไพล		สีของสาร	ลักษณะ	ร้อยละของส่วนที่แยกได้
เฮกเซน	ส่วนที่ 1	ไม่มีสี	ของเหลวใส,เป็นน้ำมัน	4.94
	ส่วนที่ 2	เหลืองอ่อน	ของเหลวใส,เป็นน้ำมัน	6.09
	ส่วนที่ 3	เหลือง	ของแข็งเป็นเกล็ด	2.96
	ส่วนที่ 4	เหลืองอ่อน	ของแข็งเป็นเกล็ด	6.36
	ส่วนที่ 5	น้ำตาลอ่อน	ของเหลวมีเกล็ด,เป็นน้ำมัน	2.01
	ส่วนที่ 6	น้ำตาลอ่อน	ของเหลวใส,เป็นน้ำมัน	1.16
	ส่วนที่ 7	น้ำตาล	ของเหลวใส,เป็นน้ำมัน	2.89
เอทิล อะซิเตท	ส่วนที่ 1	เหลืองอ่อน	ของเหลวใสมีเกล็ดเล็กน้อย	2.12
	ส่วนที่ 2	เหลือง	ของเหลวใส,เป็นน้ำมัน	5.28
	ส่วนที่ 3	น้ำตาล	ของเหลวใส,เป็นน้ำมัน	6.57
	ส่วนที่ 4	น้ำตาลเข้ม	ของเหลวใส,เป็นน้ำมัน	1.82
	ส่วนที่ 5	น้ำตาลดำ	ของแข็งขุ่น	3.30
	ส่วนที่ 6	น้ำตาลดำ	ของเหลวหนืด	3.35
	ส่วนที่ 7	น้ำตาลแดง	ของแข็งขุ่น,เป็นเกล็ด	1.52
เมทานอล	ส่วนที่ 1	เหลืองเข้ม	ของเหลวใส,เป็นน้ำมัน	1.44
	ส่วนที่ 2	น้ำตาลอ่อน	ของเหลวใส,เป็นน้ำมัน	1.56
	ส่วนที่ 3	น้ำตาล	ของเหลวหนืด	1.28
	ส่วนที่ 4	น้ำตาล	ของเหลวหนืด	3.72
	ส่วนที่ 5	น้ำตาลดำ	ของเหลวหนืด	1.32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดไพลในชั้นตัวทำละลายต่างๆ หลังนำมาแยกชั้นด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 1 โดยวิธี Disc diffusion

4.6.1 การทดสอบสารสกัดไพลในชั้นเฮกเซน

หลังจากแยกสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 1 ได้ 7 ส่วน จึงนำสารสกัดทั้ง 7 ส่วนมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion พบว่า สารสกัดไพลในชั้นเฮกเซนส่วนที่ 1 และส่วนที่ 7 ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดี โดยส่วนที่ 1 ยับยั้งการเจริญได้ในแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยมีขนาดวงใสของการยับยั้งการเจริญตั้งแต่ 8.01 – 36.43 มิลลิเมตร แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* ในส่วนที่ 7 ยับยั้งการเจริญได้ในแบคทีเรียแกรมบวก และยีสต์ โดยมีขนาดวงใสตั้งแต่ 9.59 – 22.13 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.8

เมื่อนำข้อมูลผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์วิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนในส่วนที่ 1 และส่วนที่ 7 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบที่นำมาใช้ทดสอบได้ดีและมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนในส่วนที่ 2 3 4 5 และ 6 รวมทั้งสารสกัดหยาบไพล สารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนเฉพาะส่วนที่ 1 เท่านั้นที่มีผลยับยั้งการเจริญของรา และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนในส่วนที่ 2 3 4 5 6 และ 7 รวมทั้งสารสกัดหยาบจากไพล แสดงข้อมูลเปรียบเทียบทางสถิติดังตารางที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนแต่ละส่วน ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี โดยวิธี Disc diffusion

สารสกัด		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (mm. ± SD.)											
		B.cereus	*B.subtilis*	*S.aureus*	*E.coli*	*P.aeruginosa*	*S.typhimurium*	*C.albican*	*S.cerevisiae*	*A.flavus*	*A.fumigatus*	*A.niger*	*R.oligosporus*
Hexane	ส่วนที่ 1	13.48±0.357	8.01±0.854	11.77±0.505	11.99±1.282	-	11.14±0.965	28.77±0.252	36.43±1.150	10.47±0.603	22.73±0.153	26.33±0.503	10.67±0.289
	ส่วนที่ 2	-	-	-	-	-	-	23.97±1.021	28.33±0.629	-	15.07±0.907	13.13±0.115	7.07±0.577
	ส่วนที่ 3	-	-	-	-	-	-	-	10.00±0.346	-	-	-	8.53±0.493
	ส่วนที่ 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.07±0.153	-	9.03±0.153
	ส่วนที่ 5	8.79±0.551	-	14.23±1.384	-	-	-	-	9.77±0.603	-	-	-	8.17±0.416
	ส่วนที่ 6	9.76±0.869	7.15±0.453	11.60±0.656	-	-	9.0±1.299	9.50±0.200	16.77±0.551	7.10±0.173	14.37±0.681	-	8.23±0.306
	ส่วนที่ 7	11.23±0.561	9.59±0.952	13.85±1.201	-	-	11.11±0.884	16.83±0.473	22.13±1.789	-	-	-	-
	สารสกัดหยาบ	7.96±0.273	6.93±1.277	7.23±0.252	-	-	-	18.63±0.306	21.30±0.265	7.53±0.305	16.07±0.153	17.57±0.208	9.63±0.321

หมายเหตุ ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ 10 มิลลิกรัมต่อแผ่น disc, แผ่น disc มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร สารสกัดไพลละลายใน tween80 ร้อยละ 5

- : ไม่เกิดวงใสจากการต้านจุลินทรีย์ (clear zone)

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนแต่ละส่วน ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีโดยวิธี Disc diffusion

สารสกัด		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)											
		B.cereus	*B.subtilis*	*S.aureus*	*E. coli*	*P.aeruginosa*	*S.typhimurium*	*C.albican*	*S.cerevisiae*	*A.flavus*	*A.fumigatus*	*A. niger*	*R.oligosporus*
Hexane	ส่วนที่ 1	13.48^{a}	8.01^{b}	11.77^{b}	11.99^{a}	6.00^{a}	11.14^{a}	28.77^{a}	36.43^{a}	10.47^{a}	22.73^{a}	26.33^{a}	10.67^{a}
	ส่วนที่ 2	6.00^{f}	6.00^{d}	6.00^{c}	6.00^{b}	6.00^{a}	6.00^{c}	23.97^{b}	28.33^{b}	6.00^{d}	15.07^{c}	13.13^{c}	7.07^{e}
	ส่วนที่ 3	6.00^{f}	6.00^{d}	6.00^{c}	6.00^{b}	6.00^{a}	6.00^{c}	6.00^{f}	10.00^{c}	6.00^{d}	6.00^{e}	6.00^{d}	8.53^{cd}
	ส่วนที่ 4	6.00^{f}	6.00^{d}	6.00^{c}	6.00^{b}	6.00^{a}	6.00^{c}	6.00^{f}	6.00^{c}	6.00^{d}	8.07^{d}	6.00^{d}	9.03^{c}
	ส่วนที่ 5	8.79^{d}	6.00^{d}	14.23^{a}	6.00^{b}	6.00^{a}	6.00^{c}	6.00^{f}	9.77^{c}	6.00^{d}	6.00^{e}	6.00^{d}	8.17^{d}
	ส่วนที่ 6	9.77^{c}	7.15^{c}	11.60^{b}	6.00^{b}	6.00^{a}	9.0^{b}	9.50^{e}	16.77^{d}	7.10^{c}	14.37^{c}	6.00^{d}	8.23^{d}
	ส่วนที่ 7	11.23^{b}	9.59^{a}	13.86^{a}	6.00^{b}	6.00^{a}	11.11^{a}	16.83^{d}	22.13^{e}	6.00^{d}	6.00^{e}	6.00^{d}	6.00^{f}
	สารสกัดหยาบ	7.96^{e}	6.93^{c}	7.23^{c}	6.00^{b}	6.00^{a}	6.00^{c}	18.63^{c}	21.30^{c}	7.53^{b}	16.07^{b}	17.57^{b}	9.63^{b}

หมายเหตุ สารสกัดไพลละลายใน tween80 ร้อยละ 5, ใช้ปริมาณของสารสกัด 10 มิลลิกรัมต่อแผ่น disc, แผ่น disc มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.6.2 การทดสอบสารสกัดไพลในชั้นเอทิลอะซิเตท

หลังจากแยกสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีได้เป็น 7 ส่วน จึงนำสารสกัดทั้ง 7 ส่วนมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion พบว่าสารสกัดไพลในชั้นเอทิลอะซิเตทส่วนที่ 2 ยับยั้งการเจริญได้ดีในเชื้อราและยีสต์ โดยมีขนาดวงใสของการยับยั้งการเจริญตั้งแต่ 10.63 – 28.50 มิลลิเมตร แต่มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้น้อยกว่าสารสกัดหยาบไพลในชั้นเอทิลอะซิเตทซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าเชื้อยีสต์และเชื้อรา โดยมีขนาดวงใสตั้งแต่ 10.90 – 22.63 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.10

เมื่อนำข้อมูลผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทในส่วนที่ 2 สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ และราที่นำมาใช้ทดสอบได้ดีและมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทในส่วนที่ 1 3 4 5 6 และ 7 รวมทั้งสารสกัดหยาบไพล และสารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ให้ผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีและมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทในส่วนที่ 1 2 3 4 5 6 และ 7 แสดงข้อมูลเปรียบเทียบทางสถิติดังตารางที่ 4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทแต่ละส่วน ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี โดยวิธี Disc diffusion

สารสกัด		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (mm. ± SD.)											
		B.cereus	*B.subtilis*	*S.aureus*	*E.coli*	*P.aeruginosa*	*S.typhimurium*	*C.albican*	*S.cerevisiae*	*A.flavus*	*A.fumigatus*	*A.niger*	*R.oligosporus*
Etyl Acetate	ส่วนที่ 1	11.70±0.882	9.05±1.020	11.73±0.642	9.18±0.725	7.76±0.121	7.83±0.415	-	-	-	8.30±0.436	7.57±0.252	-
	ส่วนที่ 2	10.87±1.115	10.63±1.442	13.88±0.232	8.48±0.691	-	8.45±0.776	12.93±0.305	-	10.63±0.578	25.17±0.208	28.50±0.500	11.90±1.044
	ส่วนที่ 3	14.72±0.425	8.9±0.548	19.22±4.477	-	-	8.81±0.455	-	-	-	9.87±0.850	6.97±0.153	6.80±0.458
	ส่วนที่ 4	14.66±1.132	9.92±0.585	29.25±0.735	-	-	-	-	-	-	9.80±0.200	-	8.93±0.305
	ส่วนที่ 5	12.93±2.586	-	21.35±1.118	-	-	-	-	-	-	-	-	7.30±0.200
	ส่วนที่ 6	12.30±0.671	9.12±0.701	16.94±0.736	-	-	-	11.97±0.058	20.13±0.306	-	-	-	-
	ส่วนที่ 7	-	-	-	-	-	-	10.77±0.289	10.40±0.200	-	-	-	-
	ก่อนแยก	22.63±2.633	18.30±2.525	16.78±2.91	19.58±0.497	13.53±1.039	10.90±0.402	12.30±0.173	9.19±0.252	-	11.97±1.550	10.63±0.586	9.73±0.702

หมายเหตุ ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ 10 มิลลิกรัมต่อแผ่น disc, แผ่น disc มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร สารสกัดไพลละลายใน tween80 ร้อยละ 5

- : ไม่เกิดวงใสจากการต้านจุลินทรีย์ (clear zone)

ตารางที่ 4.11 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทแต่ละส่วน ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีโดยวิธี Disc diffusion

สารสกัด		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)											
		B.cereus	*B.subtilis*	*S.aureus*	*E. coli*	*P.aeruginosa*	*S.typhimurium*	*C.albican*	*S.cerevisiae*	*A.flavus*	*A.fumigatus*	*A.niger*	*R.oligosporus*
Ethyl Acetate	ส่วนที่ 1	11.70^{c}	9.05^{b}	11.73^{c}	9.18^{b}	7.76^{b}	7.83^{bc}	6.00^{c}	6.00^{d}	6.00^{b}	8.30^{d}	7.57^{c}	6.00^{d}
	ส่วนที่ 2	10.87^{c}	10.63^{b}	13.88^{dc}	8.48^{c}	6.00^{c}	8.45^{b}	12.93^{a}	6.00^{d}	10.63^{a}	25.17^{a}	28.50^{a}	11.90^{a}
	ส่วนที่ 3	14.72^{b}	8.95^{b}	19.22^{bc}	6.00^{d}	6.00^{c}	8.81^{b}	6.00^{c}	6.00^{d}	6.00^{b}	9.87^{c}	6.97^{d}	6.80^{cd}
	ส่วนที่ 4	14.66^{b}	9.92^{b}	29.25^{a}	6.00^{d}	6.00^{c}	6.00^{c}	6.00^{c}	6.00^{d}	6.00^{b}	9.80^{c}	6.00^{c}	8.93^{b}
	ส่วนที่ 5	12.93^{bc}	6.00^{c}	21.35^{b}	6.00^{d}	6.00^{c}	6.00^{c}	6.00^{c}	6.00^{d}	6.00^{b}	6.00^{e}	6.00^{e}	7.30^{c}
	ส่วนที่ 6	12.30^{bc}	9.12^{b}	16.94^{cd}	6.00^{d}	6.00^{c}	6.00^{c}	11.97^{c}	20.13^{a}	6.00^{b}	6.00^{e}	6.00^{e}	6.00^{d}
	ส่วนที่ 7	6.00^{d}	6.00^{c}	6.00^{f}	6.00^{d}	6.00^{c}	6.00^{c}	10.77^{d}	10.40^{b}	6.00^{b}	6.00^{e}	6.00^{e}	6.00^{d}
	สารสกัดหยาบ	22.63^{a}	18.30^{a}	16.78^{cd}	19.58^{a}	13.53^{a}	10.90^{a}	12.30^{b}	9.19^{c}	6.00^{b}	11.97^{b}	10.63^{b}	9.73^{b}

หมายเหตุ สารสกัดไพลละลายใน tween80 ร้อยละ 5, ใช้ปริมาณของสารสกัด 10 มิลลิกรัมต่อแผ่น disc, แผ่น disc มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.6.3 การทดสอบสารสกัดไพลในชั้นเมทานอล

หลังจากแยกสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเมทานอลโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีได้เป็น 5 ส่วน จึงนำสารสกัดทั้ง 5 ส่วนมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion พบว่า สารสกัดไพลในชั้นเมทานอลส่วนที่ 4 และส่วนที่ 1 ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดี ส่วนที่ 4 ยับยั้งการเจริญได้ในแบคทีเรีย และยีสต์ โดยมีขนาดวงใสของการยับยั้งการเจริญตั้งแต่ 8.93 – 19.30 มิลลิเมตร ในส่วนที่ 1 ยับยั้งการเจริญได้ดีในรา โดยมีขนาดวงใสตั้งแต่ 8.70 – 17.67 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.12

เมื่อนำข้อมูลผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเมทานอลในส่วนที่ 4 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบที่นำมาใช้ทดสอบได้ดีและมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเมทานอลในส่วนที่ 1 2 3 และ 5 รวมทั้งสารสกัดหยาบไพล สารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเมทานอลเฉพาะส่วนที่ 1 เท่านั้นที่มีผลยับยั้งการเจริญของรา และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเมทานอลในส่วนที่ 2 3 4 และ 5 รวมทั้งสารสกัดหยาบจากไพล แสดงข้อมูลทางสถิติดังตารางที่ 4.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเมทานอลแต่ละส่วน ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีโดยวิธี Disc diffusion

สารสกัด		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (mm. ± SD.)											
		B.cereus	*B.subtilis*	*S.aureus*	*E.coli*	*P.aeruginosa*	*S.typhimurium*	*C.albican*	*S.cerevisiae*	*A.flavus*	*A.fumigatus*	*A.niger*	*R.oligosporus*
Methanol	ส่วนที่ 1	6.7±0.625	-	7.37±0.451	-	-	7.63±0.513	-	-	8.70±0.755	17.67±1.209	15.63±0.252	14.367±0.251
	ส่วนที่ 2	9.6±1.054	6.83±0.153	13.17±0.577	-	-	7.97±0.321	10.40±1.100	-	-	6.73±0.153	-	8.47±0.379
	ส่วนที่ 3	13.03±2.470	12.53±0.208	13.30±0.173	9.63±0.153	7.97±0.289	15.23±0.764	12.00±0.700	11.43±0.404	-	7.20±0.265	-	9.37±0.764
	ส่วนที่ 4	14.97±3.055	14.53±0.577	19.30±0.656	12.63±0.924	11.93±0.208	14.83±1.206	8.97±0.987	12.13±0.723	-	6.50±0.200	-	-
	ส่วนที่ 5	11.76±2.854	7.97±0.643	13.9±0.603	9.7±0.608	8.76±0.493	8.27±0.321	7.07±0.208	-	-	-	-	-
	ก่อนแยก	13.50±1.825	9.63±0.252	15.27±0.153	8.63±0.153	14.5±0.200	7.80±0.100	7.50±0.100	-	-	-	-	11.80±0.985

หมายเหตุ ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ 10 มิลลิกรัมต่อแผ่น disc, แผ่น disc มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร สารสกัดไพลละลายใน tween80 ร้อยละ 5

- : ไม่เกิดวงใสจากการต้านจุลินทรีย์ (clear zone)

ตารางที่ 4.13 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ของสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเมทานอลแต่ละส่วน ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีโดยวิธี Disc diffusion

สารสกัด		ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)											
		B.cereus	*B.subtilis*	*S.aureus*	*E.coli*	*P.aeruginosa*	*S.typhimurium*	*C.albican*	*S.cerevisiae*	*A.flavus*	*A.fumigatus*	*A.niger*	*R.oligosporus*
Methanol	ส่วนที่ 1	6.70^{c}	6.00^{f}	7.37^{e}	6.00^{d}	6.00^{e}	7.63^{b}	6.00^{c}	6.00^{c}	8.70^{a}	17.67^{a}	15.63^{a}	14.37^{a}
	ส่วนที่ 2	9.60^{bc}	6.83^{e}	13.17^{d}	6.00^{d}	6.00^{e}	7.97^{b}	10.40^{b}	6.00^{c}	6.00^{b}	6.73^{bc}	6.00^{b}	8.47^{c}
	ส่วนที่ 3	13.03^{ab}	12.53^{b}	13.30^{cd}	9.63^{b}	7.97^{d}	15.23^{a}	12.00^{a}	11.43^{b}	6.00^{b}	7.20^{b}	6.00^{b}	9.37^{c}
	ส่วนที่ 4	14.97^{a}	14.53^{a}	19.30^{a}	12.63^{a}	11.93^{b}	14.83^{a}	8.97^{c}	12.13^{a}	6.00^{b}	6.50^{bc}	6.00^{b}	6.00^{d}
	ส่วนที่ 5	11.77^{ab}	7.97^{d}	13.97^{c}	9.70^{b}	8.77^{c}	8.27^{b}	7.07^{dc}	6.00^{c}	6.00^{b}	6.00^{c}	6.00^{b}	6.00^{d}
	ก่อนแยก	13.50^{ab}	9.63^{c}	15.27^{b}	8.63^{c}	14.50^{a}	7.80^{b}	7.50^{d}	6.00^{c}	6.00^{b}	6.00^{c}	6.00^{b}	11.80^{b}

หมายเหตุ สารสกัดไพลละลายใน tween80 ร้อยละ 5, ใช้ปริมาณของสารสกัด 10 มิลลิกรัมต่อแผ่น disc, แผ่น disc มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.7 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดไพลโดยหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ (MIC) โดยวิธี Broth dilution

นำสารสกัดไพลที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียยีสต์และราโดยทำให้เกิดบริเวณวงใส เมื่อทดสอบโดยวิธี Disc diffusion มาหาค่า MIC โดยวิธี Broth dilution ลดความเข้มข้นของสารสกัดไพลลงทีละครึ่งจาก 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 100 50 25 12.50 6.25 และ 3.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้โดยดูจากค่าความขุ่น (OD) ถ้าความขุ่นเพิ่มขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถเจริญได้ แต่ถ้าความขุ่นลดลงหรือไม่เพิ่มขึ้นแสดงว่าสารสกัดไพลที่ความเข้มข้นนั้นยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.6 พบว่าสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนส่วนที่ 1 (H1) และส่วนที่ 7 (H7) ให้ผลการทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion ดีกว่าสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนในส่วนอื่น (ส่วนที่ 2 3 4 5 และ 6) จึงนำสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนในส่วนที่ 1 และ ส่วนที่ 7 มาทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ จากการทดลองพบว่า สารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนส่วนที่ 1 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ที่นำมาทดสอบได้ทุกตัวโดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดไพล 3.13 – 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนส่วนที่ 7 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดไพล 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้บางชนิดเท่านั้น โดยสามารถยับยั้ง *Salmonella typhimurium* ได้ และสามารถยับยั้งยีสต์ได้โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถยับยั้งราได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.14

สารสกัดไพลในชั้นเอทิลอะซิเตทส่วนที่ 2 (E2) มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อยีสต์และเชื้อราได้ดี โดยใช้สารสกัดไพลในความเข้มข้น 6.25 – 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ในระดับปานกลางที่ความเข้มข้น 25 – 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดไพลในชั้นเมทานอลส่วนที่ 4 (M4) มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ได้ โดยใช้สารสกัดไพลในความเข้มข้น 25 – 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อราได้เลย ดังแสดงในตารางที่ 4.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของส่วนสกัดไพลภายหลังการแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 1 ด้วยวิธี Broth Dilution

สารที่ใช้ทดสอบ		เชื้อจุลินทรีย์	MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
ไพลในชั้นเฮกเซน	H1	*Bacillus cereus*	3.13
		Bacillus subtilis	3.13
		Staphylococcus aureus	3.13
		E. coli	3.13
		Pseudomonas aeruginosa	6.25
		Salmonella typhimurium	12.50
		Candida albican	6.25
		Saccharomyces cerevisiae	3.13
		Aspergillus flavus	6.25
		Aspergillus fumigatus	3.13
		Aspergillus niger	12.50
		Rhizopus oligosporus	12.50
	H7	*Bacillus cereus*	25.00
		Bacillus subtilis	25.00
		Staphylococcus aureus	25.00
		E. coli	> 200.00
		Pseudomonas aeruginosa	200.00
		Salmonella typhimurium	50.00
		Candida albican	25.00
		Saccharomyces cerevisiae	25.00
		Aspergillus flavus	> 200.00
		Aspergillus fumigatus	> 200.00
		Aspergillus niger	> 200.00
		Rhizopus oligosporus	> 200.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 (ต่อ)

สารที่ใช้ทดสอบ		เชื้อจุลินทรีย์	MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
ไพลในชั้นเอทิลอะซิเตท	E2	*Bacillus cereus*	25.00
		Bacillus subtilis	25.00
		Staphylococcus aureus	50.00
		E. coli	25.00
		Pseudomonas aeruginosa	25.00
		Salmonella typhimurium	100.00
		Candida albican	6.25
		Saccharomyces cerevisiae	6.25
		Aspergillus flavus	12.50
		Aspergillus fumigatus	6.25
		Aspergillus niger	12.50
		Rhizopus oligosporus	6.25
ไพลในชั้นเมทานอล	M4	*Bacillus cereus*	25.00
		Bacillus subtilis	25.00
		Staphylococcus aureus	50.00
		E. coli	25.00
		Pseudomonas aeruginosa	25.00
		Salmonella typhimurium	25.00
		Candida albican	100.00
		Saccharomyces cerevisiae	50.00
		Aspergillus flavus	>200.00
		Aspergillus fumigatus	>200.00
		Aspergillus niger	>200.00
		Rhizopus oligosporus	>200.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 การแยกสารสกัดจากไพลโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 2

การแยกสารสกัดจากไพลโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 2 โดยนำสารสกัดจากไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนส่วนที่ 7 (H7) มาทดสอบการแยกของสารด้วยวิธี TLC พบว่าสามารถนำไปแยกต่อได้ด้วยคอลัมน์ หลังจากการแยกครั้งนี้พบว่าสารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นกว่าเดิมโดยแยกได้เป็น 2 ส่วนคือ H7.1 และ H7.2 สำหรับสารสกัดจากไพลในชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทส่วนที่ 2 (E2) สามารถแยกได้เป็น 5 ส่วน คือ E2.1 E2.2 E2.3 E2.4 และ E2.5 สารสกัดไพล ในชั้นตัวทำละลายเมทานอลส่วนที่ 4 (M4) สามารถแยกได้เป็น 3 ส่วน คือ M4.1 M4.2 และ M4.3 ซึ่งสารสกัดแต่ละส่วนจะมีลักษณะและปริมาณของสารที่แยกได้แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 แสดงลักษณะของสารสกัดไพลภายหลังการแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 2 และปริมาณของสารที่แยกได้

สารสกัดไพล		สีของสาร	ลักษณะ	ร้อยละของสารที่แยกได้
เฮกเซน 7	ส่วนที่ 1	สีเหลืองอ่อน	ของเหลวใส,เป็นน้ำมัน	1.70
	ส่วนที่ 2	สีเหลือง	ของเหลวใส,เป็นน้ำมัน	1.23
เอทิล อะซิเตท 2	ส่วนที่ 1	สีเหลืองอ่อน	ของเหลวใส,เป็นน้ำมัน	2.54
	ส่วนที่ 2	สีเหลือง	ของเหลวใส,เป็นน้ำมัน	3.80
	ส่วนที่ 3	สีเหลือง	ของแข็งเป็นเกล็ด	1.19
	ส่วนที่ 4	สีเหลือง	ของแข็งเป็นเกล็ด	1.40
	ส่วนที่ 5	สีเหลือง	ของเหลวใส	1.26
เมทานอล 4	ส่วนที่ 1	สีน้ำตาล	ของเหลวใส	1.36
	ส่วนที่ 2	สีน้ำตาล	ของเหลวใส	1.42
	ส่วนที่ 3	สีน้ำตาลเข้ม	ของเหลวใส	1.55

4.9 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดไพลหลังจากนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 2 โดยหาค่า MIC ด้วยวิธี Broth dilution

จากการทดลองในหัวข้อ 4.8 ได้นำสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนส่วนที่ 7 (H7) แยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟี พบว่าสามารถแยกได้ 2 ส่วนคือ H7.1 และ H7.2 จากนั้นนำสารสกัดไพลทั้ง H7.1 และ H7.2 มาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ (MIC) ด้วยวิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Broth dilution พบว่า สารสกัดไพลในชั้น H7.1 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีขึ้น โดยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และราที่นำมาทดสอบได้ โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดไพลในส่วนนี้ 3.13 – 25.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดจากไพลในชั้น H7.2 ไม่พบการยับยั้งจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ

สารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทส่วนที่ E2.1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าส่วน E2.2 E2.3 E2.4 และ E2.5 และสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และราได้ดี โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดไพล E2.1 เพียง 3.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้น *P.aeruginosa* และ *S.typhimurium* ซึ่งต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดมากกว่า 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดไพล E2.2 E2.3 E2.4 และ E2.5 แทบจะไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ หรือใช้ความเข้มข้นของสารสกัดมากกว่า 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรก็อาจจะมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้

สารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเมทานอลส่วน M4.1 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อยีสต์และราได้ดี โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดไพลในส่วนนี้ 3.13 – 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้เล็กน้อย โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 6.25 – 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดไพลส่วน M4.2 และ M4.3 มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ค่อนข้างน้อย ดังแสดงในตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของส่วนสกัดไพลภายหลังการแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟฟีครั้งที่ 2 ด้วยวิธี **Broth Dilution**

สารที่ใช้ทดสอบ		เชื้อจุลินทรีย์	MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
ไพลในชั้นเฮกเซน	H7.1	*Bacillus cereus*	25.00
		Bacillus subtilis	25.00
		Staphylococcus aureus	25.00
		E. coli	>200.00
		Pseudomonas aeruginosa	>200.00
		Salmonella typhimurium	25.00
		Candida albican	3.13
		Saccharomyces cerevisiae	3.13
		Aspergillus flavus	3.13
		Aspergillus fumigatus	3.13
		Aspergillus niger	3.13
		Rhizopus oligosporus	3.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 (ต่อ)

สารที่ใช้ทดสอบ		เชื้อจุลินทรีย์	MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
ไพลในชั้นเฮกเซน	H7.2	*Bacillus cereus*	>200.00
		Bacillus subtilis	>200.00
		Staphylococcus aureus	>200.00
		E. coli	>200.00
		Pseudomonas aeruginosa	>200.00
		Salmonella typhimurium	>200.00
		Candida albican	>200.00
		Saccharomyces cerevisiae	>200.00
		Aspergillus flavus	>200.00
		Aspergillus fumigatus	100.00
		Aspergillus niger	>200.00
		Rhizopus oligosporus	200.00
ไพลในชั้นเอทิลอะซิเตท	E2.1	*Bacillus cereus*	3.13
		Bacillus subtilis	3.13
		Staphylococcus aureus	3.13
		E. coli	3.13
		Pseudomonas aeruginosa	>200.00
		Salmonella typhimurium	>200.00
		Candida albican	3.13
		Saccharomyces cerevisiae	3.13
		Aspergillus flavus	3.13
		Aspergillus fumigatus	3.13
		Aspergillus niger	3.13
		Rhizopus oligosporus	3.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 (ต่อ)

สารที่ใช้ทดสอบ		เชื้อจุลินทรีย์	MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
ไพลในชั้นเอทิลอะซิเตท	E2.2	*Bacillus cereus*	>200.00
		Bacillus subtilis	100.00
		Staphylococcus aureus	200.00
		E. coli	200.00
		Pseudomonas aeruginosa	>200.00
		Salmonella typhimurium	100.00
		Candida albican	>200.00
		Saccharomyces cerevisiae	200.00
		Aspergillus flavus	200.00
		Aspergillus fumigatus	>200.00
		Aspergillus niger	200.00
		Rhizopus oligosporus	>200.00
	E2.3	*Bacillus cereus*	>200.00
		Bacillus subtilis	>200.00
		Staphylococcus aureus	>200.00
		E. coli	>200.00
		Pseudomonas aeruginosa	>200.00
		Salmonella typhimurium	>200.00
		Candida albican	>200.00
		Saccharomyces cerevisiae	>200.00
		Aspergillus flavus	>200.00
		Aspergillus fumigatus	>200.00
		Aspergillus niger	>200.00
		Rhizopus oligosporus	>200.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 (ต่อ)

สารที่ใช้ทดสอบ		เชื้อจุลินทรีย์	MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
ไพลในชั้นเอทิลอะซิเตท	E2.4	*Bacillus cereus*	>200.00
		Bacillus subtilis	>200.00
		Staphylococcus aureus	>200.00
		E. coli	>200.00
		Pseudomonas aeruginosa	>200.00
		Salmonella typhimurium	>200.00
		Candida albican	>200.00
		Saccharomyces cerevisiae	>200.00
		Aspergillus flavus	>200.00
		Aspergillus fumigatus	>200.00
		Aspergillus niger	>200.00
		Rhizopus oligosporus	>200.00
	E2.5	*Bacillus cereus*	>200.00
		Bacillus subtilis	>200.00
		Staphylococcus aureus	>200.00
		E. coli	>200.00
		Pseudomonas aeruginosa	>200.00
		Salmonella typhimurium	>200.00
		Candida albican	200.00
		Saccharomyces cerevisiae	>200.00
		Aspergillus flavus	>200.00
		Aspergillus fumigatus	>200.00
		Aspergillus niger	200.00
		Rhizopus oligosporus	>200.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 (ต่อ)

สารที่ใช้ทดสอบ		เชื้อจุลินทรีย์	MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
ไพลในชั้นเมทานอล	M4.1	*Bacillus cereus*	6.25
		Bacillus subtilis	12.50
		Staphylococcus aureus	50.00
		E. coli	25.00
		Pseudomonas aeruginosa	25.00
		Salmonella typhimurium	100.00
		Candida albican	3.13
		Saccharomyces cerevisiae	6.25
		Aspergillus flavus	3.13
		Aspergillus fumigatus	3.13
		Aspergillus niger	3.13
		Rhizopus oligosporus	3.13
	M4.2	*Bacillus cereus*	100.00
		Bacillus subtilis	100.00
		Staphylococcus aureus	>200.00
		E. coli	200.00
		Pseudomonas aeruginosa	100.00
		Salmonella typhimurium	100.00
		Candida albican	100.00
		Saccharomyces cerevisiae	100.00
		Aspergillus flavus	100.00
		Aspergillus fumigatus	100.00
		Aspergillus niger	>200.00
		Rhizopus oligosporus	12.50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 (ต่อ)

สารที่ใช้ทดสอบ		เชื้อจุลินทรีย์	MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
ไพลในชั้นเมทานอล	M4.3	*Bacillus cereus*	>200.00
		Bacillus subtilis	200.00
		Staphylococcus aureus	>200.00
		E. coli	200.00
		Pseudomonas aeruginosa	>200.00
		Salmonella typhimurium	>200.00
		Candida albican	200.00
		Saccharomyces cerevisiae	200.00
		Aspergillus flavus	200.00
		Aspergillus fumigatus	200.00
		Aspergillus niger	200.00
		Rhizopus oligosporus	12.50

4.10 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างสารที่แยกได้

4.10.1 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรเมตรีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR)

4.10.1.1 วิเคราะห์นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของโปรตอน (Proton NMR, ^{1}H-NMR)

นำสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนส่วนที่ 7 .1 (H7.1) มาวิเคราะห์สารบริสุทธิ์ ด้วยวิธีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของโปรตรอน เมื่อใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย แสดงสเปกตรัมของสารดังรูปที่ 4.25 และแสดงค่า ^{1}H chemical shift (δ) ที่น่าสนใจเมื่อเทียบกับตำแหน่งของโปรตอน แสดงดังตารางที่ 4.17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.17 แสดง ^{1}H chemical shift (δ) ที่น่าสนใจ และตำแหน่งของโปรตอน

δ (ppm)	ตำแหน่งของโปรตอน
6.7 – 7.0	H - Aromatic ring
6.3 – 6.5	- CH=CH - (H-4)
6.0 – 6.1	- CH=CH - (H-3)
3.8 และ 3.9	- OCH_3 x 2
3.6 – 3.7	- CH_2- (H-1)
2.6	- OH
2.4 – 2.5	- CH_2- (H-2)

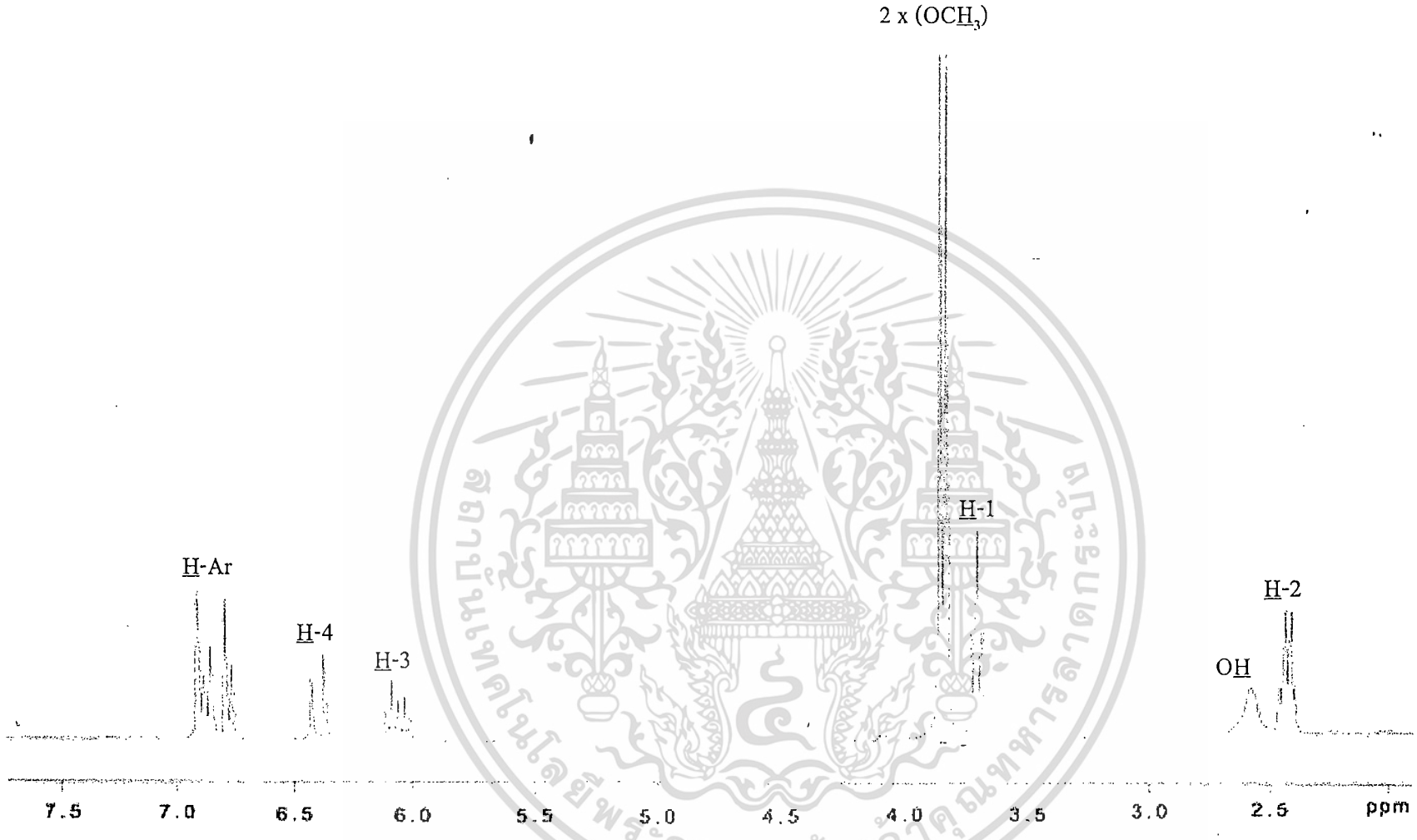
4.10.1.2 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของคาร์บอน (Carbon NMR, ^{13}C-NMR)

ผลการวิเคราะห์สารบริสุทธิ์ด้วยวิธีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของคาร์บอน เมื่อใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย แสดงสเปกตรัมของสารดังรูปที่ 4.26 และแสดงค่า ^{13}C chemical shift (δ) ที่น่าสนใจ เมื่อเทียบกับตำแหน่งของคาร์บอน ดังตารางที่ 4.18

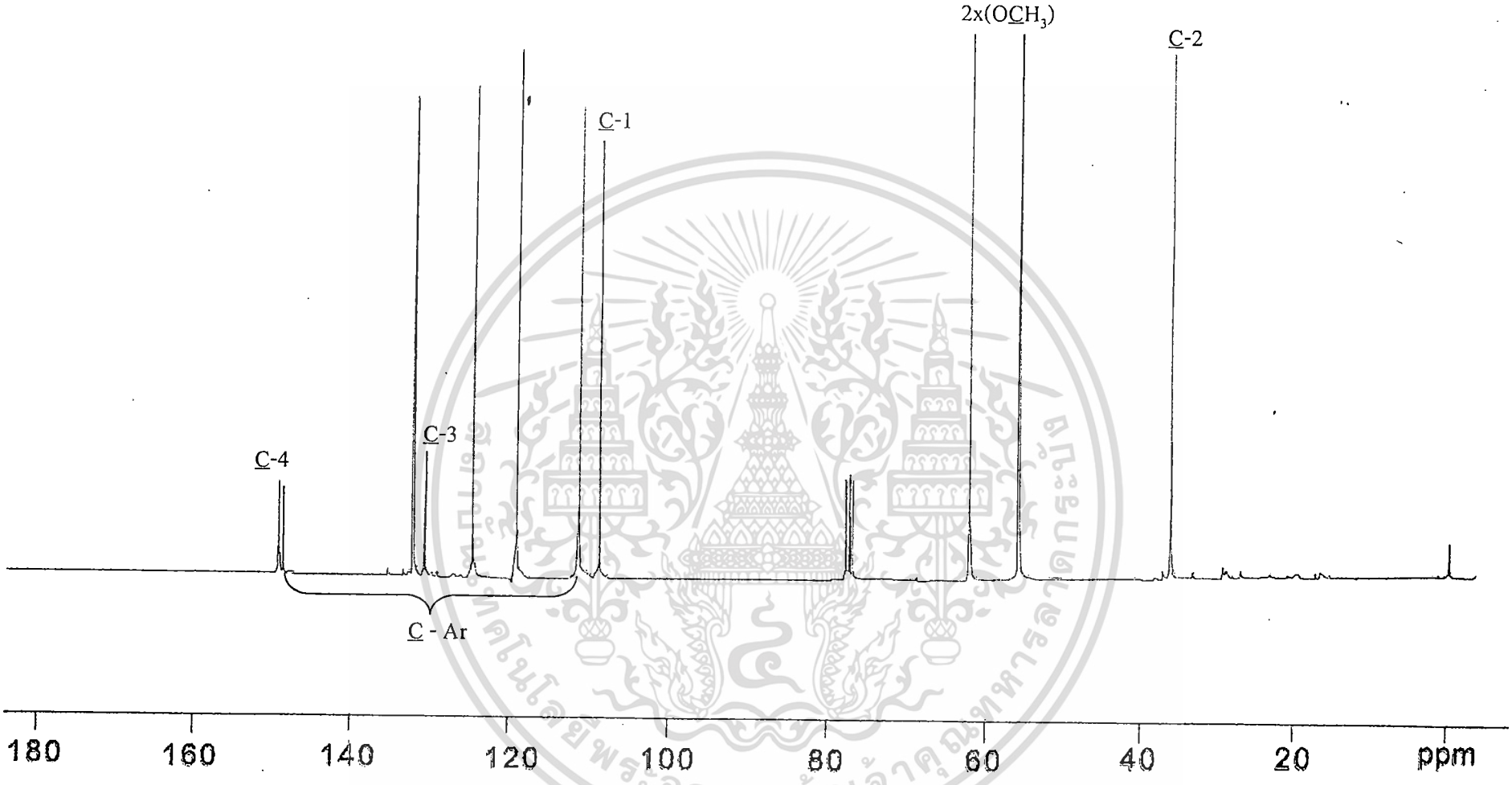
ตารางที่ 4.18 แสดง ^{13}C chemical shift (δ) ที่น่าสนใจ และตำแหน่งของคาร์บอน

δ (ppm)	ตำแหน่งของคาร์บอน
36.3	- CH_2- (C-2)
55.8 และ 55.9	- OCH_3 x 2
62.1	- CH_2OH (C-1)
130.5	- CH=CH - (C-3)
108.7 – 148.5	C - Aromatic ring
149.0	- CH=CH - (C-4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

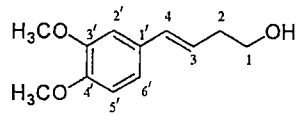


รูปที่ 4.25 แสดง ^{1}**H-NMR** สเปกตรัมของสาร (*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol



รูปที่ 4.26 แสดง ^{13}C-NMR สเปกตรัมของสาร (*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol

จากข้อมูลทั้งหมด คาดคะเนโครงสร้างของสารคร่าวๆ ได้ว่า สาร H7.1 น่าจะมีคาร์บอน 12 อะตอม มีวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic ring) และหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญคือ พันธะคู่ หมู่อีเทอร์ และหมู่ไฮดรอกซี ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 4.27



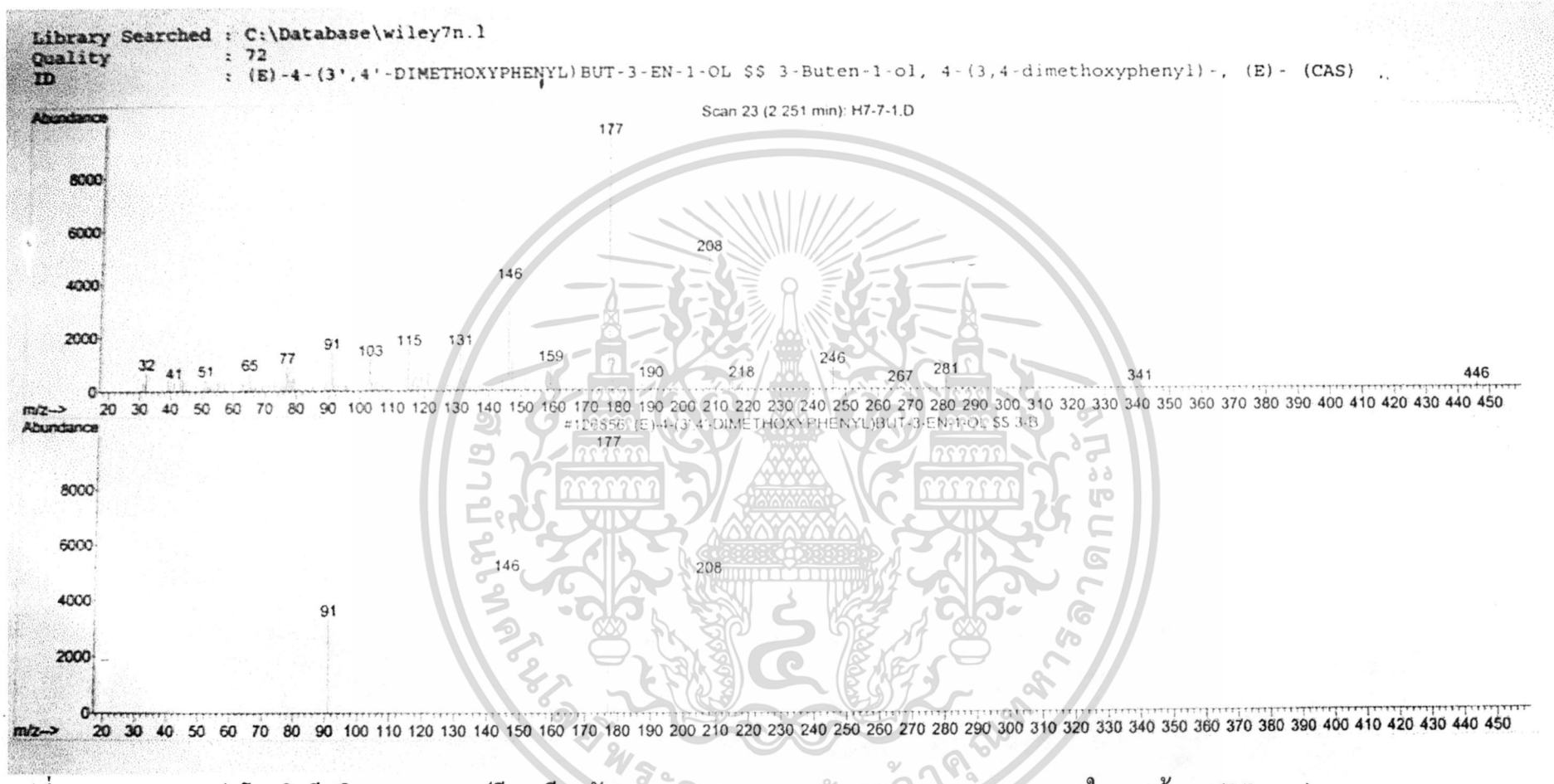
รูปที่ 4.27 แสดงสูตรโครงสร้างของสาร (*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol

ที่มา : Masuda and Jitoe (1995)

4.10.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS)

นำสารสกัดไพลส่วน H7.1 มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS สเปกตรัมแสดงดังรูปที่ 4.28 เมื่อเทียบกับสารในฐานข้อมูล (*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol เป็นสารบริสุทธิ์ที่มีมวลโมเลกุล 208 ซึ่งน่าจะเป็นสารตัวเดียวกับ (*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol ซึ่งสารตัวนี้ได้มีการค้นพบโดย (Masuda and Jitoe, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.28 แสดงผลสเปกโทรมิตรีชนิดมวล (MS) เปรียบเทียบกับสาร (*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol ในฐานข้อมูล (Library)

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 สามารถสกัดสารจากเหง้าไพลด้วยวิธีการสกัดเย็นด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ได้สารสกัดหยาบร้อยละ 2.89 1.87 และ 6.21 ต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ สารสกัดหยาบไพลในชั้นของเฮกเซนมีส่วนน้ำมันหอมระเหยค่อนข้างมากกว่าส่วนอื่น รองมาคือสารสกัดไพลในชั้นเอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ

5.2 สามารถใช้ tween 80 ร้อยละ 5 ในการเจือจางสารสกัดไพลในชั้นต่างๆ ได้ดีที่สุด และแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งจากการทดสอบการเจือจางและทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion แล้วผลการทดสอบการเจือจางของเชื้อกับ tween 80 ร้อยละ 5 ดีกว่าผลการทดสอบการเจือจางกับ tween 80 ร้อยละ 1 และ ดีกว่าผลการทดสอบการเจือจางกับ DMSO ร้อยละ 10 ตามลำดับ การทดสอบการเจือจางกับสารสกัดอาจให้ผลได้ดีกว่านี้เมื่อใช้ตัวทำละลายชนิดอื่นที่มีการเจือจางที่เหมาะสมกับสารสกัดแต่ละชนิด

5.3 สารสกัดหยาบไพลในชั้นของเฮกเซนเมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งด้วยวิธี Disc diffudsion พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อราได้ดี มีบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 7.87 – 19.27 มิลลิเมตร แต่ยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ได้น้อย ส่วนสารสกัดในชั้นเอทิลอะซิเตทนั้นยับยั้งแบคทีเรีย *B.cereus* ได้ดีที่สุด มีขนาดบริเวณยับยั้งขนาด 21.10 มิลลิเมตร และในส่วนสารสกัดไพลในชั้นของเมทานอลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีมีขนาดบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 6.90 – 17.30 มิลลิเมตร แต่ยับยั้งราได้น้อยยกเว้น *R.oligosporus* สารสกัดหยาบไพลในชั้นของเอทิลอะซิเตทให้ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด รองมาคือสารสกัดหยาบไพลในชั้นเมทานอล ส่วนในสารสกัดหยาบไพลในส่วนเฮกเซนสามารถยับยั้งเชื้อราได้ดี แต่ยับยั้งแบคทีเรียได้เล็กน้อย

5.4 สารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายทั้ง 3 ชั้น เมื่อนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี แล้วพบว่า สารสกัดที่ได้ในชั้นของเฮกเซนแยกได้ 7 ส่วน มีร้อยละของส่วนที่แยกได้ตั้งแต่ 1.16 – 6.36 ส่วนในชั้นเอทิลอะซิเตทแยกได้ 7 ส่วน มีร้อยละของส่วนที่แยกได้ตั้งแต่ 1.52 – 6.57 และในส่วนของชั้นเมทานอลแยกได้ 5 ส่วน มีร้อยละของส่วนที่แยกได้ตั้งแต่ 1.28 – 3.72 โดยสารสกัดแต่ละส่วนที่แยกได้มี spot บนแผ่น TLC ใกล้เคียงกัน ขั้นตอนการแยกสารสกัดแต่ละส่วนออกจากกันมีความสำคัญมาก จึงต้องทำด้วยความละเอียดโดยอาจทำโดยเพิ่มขั้วของตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวชะคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีทีละน้อย เพื่อให้สารที่ได้แยกออกจากกันได้ดี

5.5 เมื่อนำสารสกัดที่แยกจากคอลัมน์ครั้งที่ 1 ไปทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion จะพบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายเฮกเซนส่วนที่ 1 (H1) และส่วนที่ 7 (H7) ยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดส่วนอื่น และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสารสกัดส่วนอื่น

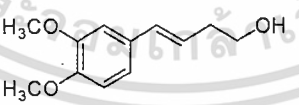
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทส่วนที่ 2 (E2) ยับยั้งยีสต์และราได้ดีมีขนาดบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 6.30-28.50 มิลลิเมตร และในส่วนของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลส่วนที่ 4 ยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 8.93 – 19.30 มิลลิเมตร และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสารสกัดส่วนอื่น

5.6 เมื่อนำสารสกัดที่แยกจากคอลัมน์ครั้งที่ 1 ไปทดสอบหาค่า MIC จะพบว่า สารสกัดไพล H1 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ทุกตัวได้ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเพียง 3.13 – 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน H7 ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน E2 ยับยั้งยีสต์และราได้ดีที่ความเข้มข้น 6.25 – 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และส่วน M4 ยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ได้ดีที่ความเข้มข้น 25 – 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion

5.7 เมื่อนำสารสกัดไพลส่วน H1 ไปฉีด GC เพื่อดูองค์ประกอบของสารพบว่าสารที่ได้มีองค์ประกอบของสารมาก โดยส่วนใหญ่จะเป็นสารจำพวกน้ำมันหอมระเหยซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้ยากกว่าสารสกัดไพลส่วน H7 ซึ่งสามารถนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีง่ายกว่า สารสกัดไพลส่วน H7 เมื่อนำมาแยกด้วยคอลัมน์ครั้งที่ 2 พบว่าสารสกัดไพลส่วน H7 สามารถแยกได้เป็น 2 ส่วน คือ ส่วน H7.1 กับส่วน H7.2 ซึ่งมีร้อยละของส่วนที่แยกได้ 1.70 และ 1.23 ตามลำดับ ในส่วนของสารสกัดไพลส่วน E2 แยกด้วยคอลัมน์ได้เป็น 5 ส่วน มีร้อยละของส่วนที่แยกได้ตั้งแต่ 1.19 – 3.80 และสารสกัดไพลส่วน M4 แยกได้ด้วยคอลัมน์ได้ 3 ส่วน มีร้อยละของส่วนที่แยกได้ตั้งแต่ 1.36 – 1.55

5.8 สารสกัดไพลส่วน H7.1 ที่แยกได้เมื่อดูจาก Spot บนแผ่น TLC พบว่ามีความบริสุทธิ์ จึงนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี NMR และ GC-MS เมื่อดูจากผลการวิเคราะห์แล้วสารที่ได้มีคาร์บอนอะตอม 12 อะตอม สูตรโมเลกุลคือ $C_{12}H_{15}OH$ และมีโครงสร้างของสารดังนี้



รูปที่ 5.1 แสดงสูตรโครงสร้างของสาร (*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กมลชัย ตรงวานิชนาม. 2543. **การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กลุ่มพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ. 2543. **คู่มือการปลูกพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ ชุดที่ 3 พืชสมุนไพรน้ำมันหอมระเหย.** กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร.

นาถฤดี สิทธิสมวงศ์. 2533. **ความเป็นพิษของไพล (Toxicity Evaluation of Plai).** รายงานการวิจัยเสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

นิพนธ์ ตังคณานุรักษ์ และ คณิตา ตังคณานุรักษ์. 2534. **สเปกโทรสโกปีด้านการวิเคราะห์.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิยดา เกียรติยิ่งอังศุลี มนัส หวังหมัด กมล สวัสดิมงคล และมงคล โมกขะสมิต. 2522. การศึกษาทางเภสัชวิทยาของสารสำคัญจากไพล. วารสารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 21(1) : 13-24.

ประพาศ ยงใจยุทธ ประเวศ วะสี และทัศนีย สุธรรมสมัย. 2528. ผลการรักษาผู้ป่วยโรคหอบ หืด ด้วยไพล. **สารศิริราช.** 37 : 435-440.

มนตรี ตู้จินดา นวลอนงค์ ศรีมารุต และสุปรีดา หัพนานนท์ 2527. การใช้ไพลรักษาโรคหืดในวัยเด็ก. **สารศิริราช.** 36 : 1-5.

มาลิน จุลศิริ. 2532. **ยาต้านจุลชีพ ความรู้พื้นฐานและการประยุกต์.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน.

รังสรรค์ ปัญญาธัญญะ วันทนา งามวัฒน์ และปราณี ชวลิตธำรงค์. 2529. การศึกษาความเป็นพิษของไพลในหนู. **สารศิริราช.** 38(6) : 1-5.

เรณู โกยสุโข และคณะ. 2530. **รายงานโครงการวิจัยย่อยที่ 4 การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ของไพลในสัตว์ทดลอง.** 65-67.

วนิดา ไทรชมภู. 2542. ฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำมันระเหยและสารเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชัน. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. ภาควิชาเภสัชศาสตร์ (เภสัชเคมีและพฤกษเคมี). มหาวิทยาลัยมหิดล.

วันดี กฤษณพันธ์. 2536. **เภสัชวินิจฉัย ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ.** กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540. **สารนุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย.** กรุงเทพฯ : โอ.เอส.พริ้นติ้งเฮ้าส์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศักดิ์ชัย อัษณคุณ และวัลภา อนันตศานต์. 2532. การศึกษาพิษโดยเฉียบพลันของน้ำสกัดไพล. **ไทยเภสัชสาร.** 3 : 14-21.

ศิริภว วงศ์รุ่งโรจน์. 2534. ผลทางไซโตเจนิติคของไพลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำอาง เนาวนิช. 2541. องค์ประกอบทางเคมีของคำมองหลวง *Gardenia sootepensis* และฤทธิ์ฆ่าหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* Fabr. ของพืชวงศ์ Zingiberaceae บางชนิด. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ (เคมีศึกษา) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อรอุมา ภู่ประเสริฐ. 2547. **การประยุกต์ใช้ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ในการพิสูจน์โครงสร้างของอินทรียสาร.** นครปฐม. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

Dechatiwongse T.1979. Preparation of plai ointment (*Zingiber cassumunar*, Roxb) as a mosquito repellent. **Bulletin of Department of Medical Science.** 21(3) : 187-192.

Dechatiwongse T. and Yoshihira K. 1973. Chemical studies on the rhizome of plai (*Zingiber cassumunar*, Roxb). **Bulletin of Department of Medical Science.** 15(4) : 1-15.

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

Martins A.P., Salgueiro L., Goncalves M.J., da Cunha A.P., Vila R., Canigueral S., Mazzoni V., Tomi F. and Casanova J. 2001. Essential oil composition and antimicrobial activity of three *Zingiberaceae* from S.Tome e Principe. **Planta Medica.** 67 : 580-584.

Masuda, T. and Jitoe, A. 1995. Phenylbutenoid monomers from the rhizomes of *Zingiber cassumunar*. **Phytochemistry.** 39 : 459-461.

Murray P.R., Baron E.J., Plaller M.A., Tenover F.C. and Yolken R.H. 1999. **Manual of clinical microbiology.** 7th ed. Washington D.C. : ASM Press.

Panthong A., Kanjanapothi D., Niwatomanum V., Tuntiwachwuttikul T. and Reutrakul V. 1990. Anti-Inflammatory Activity of compounds Isolated from *Zingiber cassumunar*. **Planta Medica.** 56 : 655.

Yokihiro O., Nobuo K. and Masatoshi H. 1991. Antiinflammatory Effect of *Zingiber cassumunar* Roxb. And Its Active Principles. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin.** 39 : 2353-2356.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://www.lab123.com

http://www.phys.ksu.edu/gene/d2f1.html

http://www.medplant.mahidol.ac.th

http://www.botanik.univie.ac.at/phytoch

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้