สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตน้ำมันหอมระเหยจากเซลล์เพาะเลี้ยงพืชโหระพา

นางสาวไปรยา สัตโกวิท
นางสาวอรอุมา เกตุชาติ

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 43965
วัน, เดือน, ปี 18 ต.ค. 2545

.b.....
.i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Volatile Oil Production in Tissue Culture of *Ocimum basilicum* Linn.

Miss Praiya Sattagowit

Miss Onuma Ketchart

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตน้ำมันหอมระเหยจากเซลล์เพาะเลี้ยงพืชโหระพา

Volatile oil production in tissue culture of *Ocimum basillicum* Linn.

โดย นางสาวไปรยา สัตโกวิท รหัสประจำตัว 41053043

นางสาวอรอุมา เกตุชาติ รหัสประจำตัว 41053089

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อ. พนา โลหะทรัพย์ทวี

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง) หัวหน้าภาค

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

(ผศ. นวรัตน์ ปานแย้ม) ประธานกรรมการ

(อ. พนา โลหะทรัพย์ทวี) กรรมการ

(ดร. กนกพร สมพรไพลิน) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตน้ำมันหอมระเหยจากเซลล์เพาะเลี้ยงพืชโหระพา
นักศึกษา นางสาวไปรยา สัตโกวิท
นางสาวอรอุมา เกตุชาติ
อาจารย์ที่ปรึกษา อ. พนา โลหะทรัพย์ทวี
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา 2544

บทคัดย่อ

การคัดเลือกอาหารแข็งสูตร MS16 สูตร ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบของต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงจากเมล็ดในขวดทดลอง พบว่า อาหารแข็งสูตร MS ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบคือ อาหารแข็ง MS สูตรที่ 11 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.0 mg/l) และสูตรที่ 15 (BA 1.0mg/l : NAA 1.5 mg/l) ตามลำดับ แคลลัสที่เกิดจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงและแคลลัสที่เกิดจากใบของโหระพาถูกนำมาเพิ่มปริมาณโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดังกล่าว เมื่อแคลลัสอายุได้ 50 วัน จึงนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ท สารสกัดอย่างหยาบที่ได้ถูกนำไปวิเคราะห์ด้วย TLC และ GC โดยใช้ยูจีนอล ลินาลูออล และแอลฟาไพนีนเป็นสารละลายมาตรฐาน เนื่องจากในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดอย่างหยาบไม่เท่ากันจึงไม่สามารถเปรียบเทียบปริมาณและองค์ประกอบของสารตัวอย่าง

อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโตกราฟี พบว่าไม่มีการผลิตน้ำมันหอมระเหยในแคลลัสแต่พบน้ำมันหอมระเหยในต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Volatile Oil Production in Tissue Culture of *Ocimum basilicum* Linn.
Name	Miss Praiya Sattagowit Miss Onuma Ketchart
Special Project Advisor	Mr. Pana Lohasubtawee
Department	Applied Biology
Academic	2001

Abstracts

Sixteen differente MS medium were tested for callus induction from hypocotyls and leaves of *Ocimum basilicum* Linn. The results showed that MS medium No.11 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.0 mg/l) and MS medium No.15 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.5 mg/l) are suitable for callus induction from hypocotyls and leaves, respectively. Fifty days old callus were collected and extracted by acetonitrile. Crude extracts were analysed by Thin Layer Chromatography (TLC) and Gas Chromatography (GC). Eugenol, linalool and α-pinene were used as standard compounds. Due to different concentration of the crude extracts, the results of TLC and GC in each experiment could not be compared.

GC analysis showed that callus derived from hypocotyls and leaves showed no peak of volatile oil but *Ocimum basilicum* plantlets, which obtained from tissue culture technique, showed a few peaks of volatile oil.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีด้วยความอนุเคราะห์จาก อ. พนา โลหะทรัพย์ทวี ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และเป็นผู้ชี้แนะแนวในการทำโครงงานพิเศษ และอาจารย์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อโครงงานพิเศษนี้ รวมถึงประธานกรรมการสอบและคณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ ซึ่งทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

อนึ่งคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่และน้อง คุณพยอม เกียรกำจร และคุณประเสริฐวิทย์ แพงคำ ซึ่งเป็นเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ เจ้าหน้าที่ธุรการ รวมทั้งพี่ปริญญาโท เพื่อน ๆ นักศึกษา รุ่นน้องภาควิชาชีววิทยาประยุกติ และผู้อุปการะที่มิอาจกล่าวนามไว้ครบถ้วนอีกหลายท่านที่ได้ช่วยเหลือ ทั้งกำลังกาย กำลังใจ กำลังความคิด ซึ่งส่งผลให้โครงงานพิเศษนี้ดำเนินไปได้อย่างราบรื่น และสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่3.1 แสดงอัตราส่วนระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ในอาหาร MS ทั้ง 16 สูตร 36
ตารางที่ 4.1 แสดงน้ำหนักของแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ทั้ง 16 สูตร 45
ตารางที่ 4.2 แสดงน้ำหนักแคลลัสจากใบที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ทั้ง 16 สูตร 46
ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณรากของแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบของโหระพาที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ทั้ง 16 สูตร 47
ตารางที่ 4.4 หลักเกณฑ์ในการเปรียบเทียบปริมาณราก 48
ตารางที่ 4.5 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของน้ำหนักแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ทั้ง 16 สูตร 49
ตารางที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ทั้ง 16 สูตรด้วยวิธี DMRT 50
ตารางที่ 4.7 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของน้ำหนักแคลลัสจากใบที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ทั้ง 16 สูตร 51
ตารางที่ 4.8 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสจากใบที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ทั้ง 16 สูตรด้วยวิธี DMRT 52
ตารางที่ 4.9 แสดงค่าความเข้มข้นของสารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัสอละต้นโหระพา 54
ตารางที่ 4.10 ตารางแสดงร้อยละขององค์ประกอบในสารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติที่ความเข้มข้น 60.00 g/l 63
ตารางที่4.11ตารางแสดงร้อยละขององค์ประกอบในสารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง ความเข้มข้น 397.77 g/l 65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 โหระพา (*Ocimum basilicum* L.)	4
รูปที่ 2.2 ตัวอย่างสารที่เรียงตัวเป็นโซ่ยาว	5
รูปที่ 2.3 ตัวอย่างสารโมโนเทอร์พีนส์	6
รูปที่ 2.4 ตัวอย่างสารเซสควิเทอร์พีนส์	7
รูปที่ 2.5 ตัวอย่างสาร acyclic terpene alcohol	7
รูปที่ 2.6 ตัวอย่างสาร acyclic terpene aldehyde	8
รูปที่ 2.7 ตัวอย่างของสาร cyclic terpene derivatives	8
รูปที่ 2.8 ตัวอย่างสารเบนซีนอยด์ที่มีกลิ่นหอม	9
รูปที่ 2.9 ตัวอย่างสารที่มีกลิ่นหอมอื่น ๆ	9
รูปที่ 2.10 การสังเคราะห์สาร FPP จาก mevalonic acid	12
รูปที่ 2.11 การสังเคราะห์สาร acyclic monoterpenes จาก GPP	13
รูปที่ 2.12 การสังเคราะห์สาร monocyclic monoterpenes จาก GPP	14
รูปที่ 2.13 วิถีการสังเคราะห์ phenylpropene	15
รูปที่ 2.14 ลักษณะของ glandular trichomes	16
รูปที่ 2.15 องค์ประกอบพื้นฐานของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี	25
รูปที่ 2.16 ดีเทคเตอร์ชนิด FID	27
รูปที่ 4.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เจริญเป็นระยะเวลา 50 วัน บนอาหารแข็ง สูตร MS ทั้ง 16 สูตร	42
รูปที่ 4.2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของใบที่เจริญเป็นระยะเวลา 50 วันบนอาหารแข็ง สูตร MS ทั้ง 16 สูตร	43
รูปที่ 4.3 แสดงต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลองเป็นระยะเวลา 50 วัน	44
รูปที่ 4.4 แสดงผลการตรวจสอบยูจีนอลจากต้นโหระพาและจากแคลลัสโดยวิธี โครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบบาง	56
รูปที่ 4.5 แสดงผลการตรวจสอบลินาโลออลจากต้นโหระพาและจากแคลลัสโดย เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบบาง	58
รูปที่ 4.6 แสดงผลการตรวจสอบแอลฟาไพนีนจากต้นโหระพาและจากแคลลัสโดย เทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นแบบเคลือบบาง	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

รูปที่ 4.7 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยง
ตามธรรมชาติความเข้มข้น 60.00 g/l 62
รูปที่4.8 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่ได้จากการ
เพาะเลี้ยงในขวดทดลองความเข้มข้น 397.77 g/l 64
รูปที่ 4.9 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยง
ในสูตรอาหาร MS ที่ 11 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.0 mg/l) ความเข้มข้น 451.45 g/l 66
รูปที่ 4.10 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัสจากใบในสูตรอาหาร
MS ที่ 15 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.5 mg/l) ความเข้มข้น 535.00 g/l 68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
-วัตถุประสงค์	2
- ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	
2.1 โหระพา	3
2.2 องค์ประกอบทางเคมี	5
2.3 วิถีการสังเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอม	11
2.4 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	17
2.5 วิธีการผลิตน้ำมันหอมระเหย	21
2.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอม	23
2.7 เอกสารการวิจัย	28
บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงาน	31
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	41
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	70
เอกสารอ้างอิง	72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

น้ำมันหอมระเหยมีองค์ประกอบเป็นสารระเหยที่มีกลิ่นหอม เรียกชื่อตามส่วนของพืชที่มีกลิ่นหอม มีการสกัดโดยวิธีการทางกายภาพและตามคุณลักษณะของกลิ่นที่มีอยู่ น้ำมันหอมแต่ละชนิดมาจากพืชชนิดใดชนิดหนึ่งหรือสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่ง หรือพืชชนิดหนึ่งอาจให้น้ำมันหอมหลายชนิด เนื่องจากมีการจำแนกออกตามองค์ประกอบทางเคมีและพันธุกรรมที่แตกต่างกันไป นอกจากนั้นในส่วนต่าง ๆ ของพืชอาจให้น้ำมันหอมที่แตกต่างกัน ปัจจัยด้านสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชในลักษณะต่าง ๆ กัน อาจมีผลต่อองค์ประกอบของน้ำมันหอม น้ำมันหอมสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายรูปแบบ ตัวอย่างเช่น ใช้เป็นสารให้ความหอม สารปรุงแต่งรสชาติอาหาร และยา ด้านการแพทย์ น้ำมันหอมมีบทบาทสำคัญในการรักษาโรค ใช้สูดดม แก้หวัด ใช้เป็นน้ำมันทาถูแก้ปวดเมื่อย ใช้เป็นส่วนประกอบของสารฆ่าเชื้อ และใช้ประโยชน์ในสุวคนธบำบัด (Aromatherapy) ส่วนบทบาทในด้านอุตสาหกรรม คือ ใช้ปรุงแต่งกลิ่นของผลิตภัณฑ์ (Functional Perfumery) เช่น เครื่องสำอาง สบู่ ผงซักฟอก นอกจากนี้ น้ำมันหอมยังเป็นแหล่งสำคัญของสารหลายชนิด โดยเฉพาะลินาลูล (linalool) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ใช้ในการผลิตวิตามินอี

เนื่องด้วยคุณสมบัติของน้ำมันหอมที่นำมาใช้ประโยชน์ได้มากมายหลายด้าน จึงมีผู้สนใจศึกษาค้นคว้าเพื่อพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ เกี่ยวกับน้ำมันหอม ทำให้เกิดความก้าวหน้าในด้านการแยกสารบริสุทธิ์และสารที่เป็นองค์ประกอบจากน้ำมันหอม รวมถึงการพัฒนากลิ่นหอมใหม่ ๆ อีกหลายกลิ่น ซึ่งความหอมที่ได้จากธรรมชาติยังไม่สามารถนำสารสังเคราะห์มาใช้ทดแทนกันได้ ปัจจุบันพืชสมุนไพรได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย โหระพาเป็นพืชชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาสกัดน้ำมันหอม เนื่องจากน้ำมันหอมจากโหระพามีสารสำคัญที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และไล่แมลงได้ การขยายการผลิตไปในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นที่จะต้องทำให้ปริมาณการผลิตและคุณภาพของน้ำมันหอมมีความแน่นอน การสกัดจากใบโหระพาที่เพาะปลูกตามธรรมชาติให้ปริมาณน้ำมันหอมเพียง 0.2-0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเท่านั้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทดลองนำข้อดีของการเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง ได้แก่ ใช้พื้นที่เพาะปลูกน้อย และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตได้ มาประยุกต์ใช้เพื่อผลิตน้ำมันหอม และนำมาศึกษาองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโหระพในขวดทดลอง

1.1 วัตถุประสงค์

ศึกษาและเปรียบเทียบองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากโหระพาเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง กับที่เพาะปลูกตามธรรมชาติ

1.2 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

นำลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบของต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงจากเมล็ดในขวดทดลองมาชักนำให้เกิดแคลลัส นำแคลลัสดังกล่าวและต้นโหระพาที่ปลูกในขวดทดลอง รวมทั้งต้นโหระพาที่ปลูกตามธรรมชาติมาสกัดน้ำมันหอมระเหย จากนั้นนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบหลักโดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) และ แก๊สโครมาโทกราฟี Gas chromatography (GC)

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยที่ปลูกในขวดทดลองและที่ปลูกตามธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

2.1 โหระพา

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

โหระพาจัดอยู่ใน family Labiatae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ocimum basilicum* L. และมีชื่อสามัญว่า Sweet Basil เป็นพืชที่มีอายุหลายฤดู เมล็ดมีสีดำเป็นมัน ลำต้นจะแตกแขนงได้มาก มีขนตรงผิวลำต้นมีสีเขียวปนม่วงและมีขนอ่อนปกคลุม ใบเรียงตัวแบบตรงกันข้าม ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อยห่าง ยาวไม่เกิน 2 นิ้ว มีสีค่อนข้างม่วงและมีก้านใบยาว ดอกมีขนาดเล็กสีขาวหรือม่วง ดอกเป็นชั้น ๆ คล้ายฉัตร มีสีขาวหรือสีแดงอ่อน ในแต่ละดอกมีเกสรตัวผู้ 4 อัน รังไข่แต่ละอันมี 4 ห้อง (บัญญัติ, 2524)

ถิ่นกำเนิดและเขตการแพร่กระจาย

ถิ่นกำเนิดของโหระพายังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีพบปลูกแพร่กระจายอยู่ทั่วไป โดยพบตั้งแต่เอเชียเขตร้อนจนถึงโพลีนีเซีย (Polynesia) นอกจากนี้มีพบปลูกในตอนใต้ของฝรั่งเศสและประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน รวมทั้งในสหรัฐอเมริกา อินเดีย ฟิลิปปินส์ เอเชียเขตร้อน อิหร่าน อิตาลี ฮังการี เบลเยี่ยม โปแลนด์และประเทศในทวีปยุโรปอื่น ๆ ในอาฟริกาตะวันตกได้แก่ กีเนีย (Guinea) คองโก อาฟริกาตะวันออก ได้แก่ แทนกายิกา (Tanganyika) เกาะโคโมโร (Comoro Islands) และสาธารณรัฐมาลากาซี ตลอดจนในอินเดียตะวันออกและศรีลังกา

ประโยชน์

โหระพาใช้เป็นเครื่องปรุงแต่งกลิ่นและรสอาหาร น้ำมันจากโหระพาใช้แต่งกลิ่นของลูกกวาด ขนมปัง ไส้กรอกและเครื่องดื่ม นอกจากนี้ยังใช้ไล่แมลง เช่น หมัดและแมลงวัน ใช้ทำเครื่องสำอาง ถ้ารับประทานน้ำต้มจากใบจะใช้เป็นยาขับลมในท้องและเป็นยาบำรุงกำลัง น้ำโหระพาใช้สูดดมแก้หวัด ยาต้มที่ได้จากโหระพาใช้ล้างแผล หนอง ฝี แก้อาเจียน สะอึกและไซนัส รากใช้แก้ปวดท้องในเด็ก ใบใช้แก้โรคทราง แก้มึนเมา ใช้ขับประจำเดือน ใช้เป็นยาบำรุงสำหรับสตรีที่ตั้งครรภ์ น้ำจากเปลือกหุ้มเมล็ดใช้ขับปัสสาวะ รักษาโรคไต ท้องร่วง โรคลำไส้ในเด็ก (รวมพร, 2524)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.1: โหระพา (*Ocimum basilicum* L.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 องค์ประกอบทางเคมี

น้ำมันหอมมีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด มีการจำแนกสารประกอบออกเป็น 4 กลุ่มหลักตามความสำคัญและลักษณะของสาร (พีรศักดิ์, 2544) ดังนี้

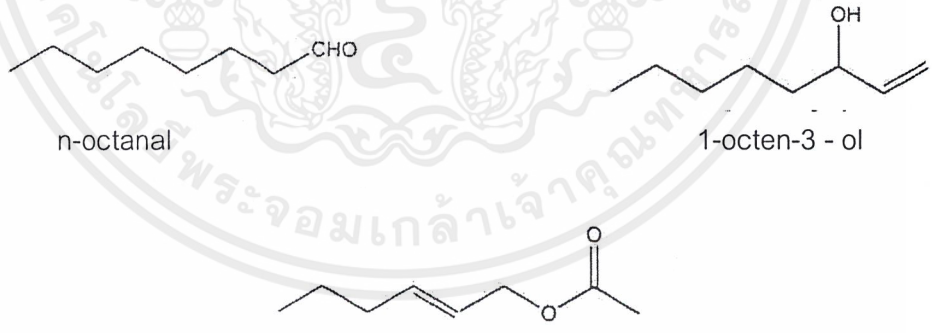
1. **สารที่เรียงตัวเป็นโซ่ยาว** (Aliphatic Compounds)

สารที่เรียงตัวเป็นโซ่ยาวมีมากในอาหาร เช่น ผลไม้ มีกลิ่นเล็กน้อย ยกเว้นสารบางชนิด เช่น 3-octanol ในเห็ดซึ่งปล่อยกลิ่นที่มีลักษณะเฉพาะตัวชัดเจน สาร 1-octen-3 -ol ในน้ำมันลาเวนเดอร์และเห็ด เป็นสารที่มีกลิ่นเห็ดมากและมีกลิ่น earthy-forest เป็นต้น กลุ่มของสารที่เรียงตัวเป็นโซ่ยาว ได้แก่

1.1 Aliphatic aldehydes เป็นสารสำคัญในเครื่องหอมและสารที่ใช้ในการปรุงแต่งรสชาติอาหาร ตัวอย่างเช่น กลุ่มของสาร n-octanol, n-nonanal, n-decanal และ n -undecanal ที่มีอยู่ในน้ำมันผิวส้ม

1.2 Aliphatic ketones ซึ่งมีเพียง 3-hydroxy-2-butanone (acetoin) และ diacetyl (2,3 - butanedione)

1.3 Aliphatic esters เป็นสารสำคัญที่ให้รสชาติและกลิ่นหอม เช่น สารอะซีเตตของแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอน 6 และ 12 ตัว (รูปที่ 2.2)



n-octanal 1-octen-3 - ol

trans-2-hexenyl acetate

รูปที่ 2.2 ตัวอย่างสารที่เรียงตัวเป็นโซ่ยาว

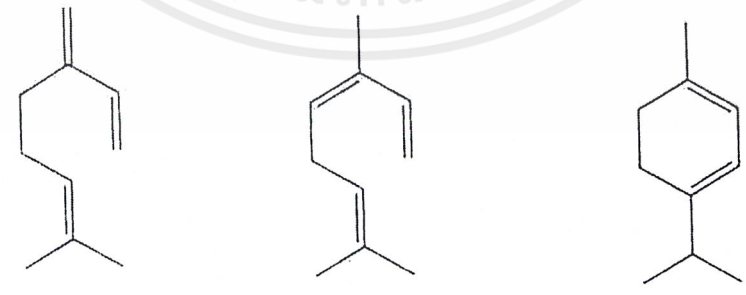
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. **สารเทอร์พีนส์และสารอนุพันธ์ของเทอร์พีนส์** (Terpene and Terpene derivatives)

เทอร์พีนส์เป็นองค์ประกอบของสารหลายกลุ่ม มีสูตรโครงสร้างแตกต่างกันอย่างกว้างขวางแต่มีส่วนของโครงสร้างที่เหมือนกันคือมี isoprene (C_5H_8) unit 2 ชุด (monoterpenes), 3 ชุด (sesquiterpenes) หรือมากกว่า

สารโมโนเทอร์พีนส์มีสูตรโมเลกุล $C_{10}H_{16}$ อาจอยู่ในรูปของ acyclic, monocyclic หรือ bicyclic มีที่อยู่ในรูปของ tricyclic 2-3 ชนิด ได้แก่ ไซโคลเฟนซีน (cyclofenchene) และไตรไซคลีน (tricyclene) สาร acyclic monoterpenes ค่อนข้างไม่คงตัวและบางชนิมีกลิ่นแรง เนื่องจากมีสูตรโครงสร้างไม่อิ่มตัว (unsaturated structure) ตัวอย่างของสาร acyclic monoterpenes ได้แก่ ไมร์ซีน (myrcene) และโอซิมีน (ocimene)

สาร cyclic monoterpenes มีอยู่ในน้ำมันหอม ในบางครั้งมีอยู่ในปริมาณมากพอประมาณจัดเป็นสารที่มีกลิ่นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่เป็นสารเริ่มต้นในการสังเคราะห์ทางชีวภาพหรือทางเคมีของสารที่ให้รสชาติและกลิ่น ตัวอย่างของสาร monocyclic terpenes ได้แก่ แอลฟา-เทอร์พินีน (α- terpinene), แกมมา-เทอร์พินีน (γ- terpinene) หรือ พารา- เมนธาไดอีน (menthadiene), ลิโมนีน (limonene), เทอร์พิโนลีน (terpinolene) สาร bicyclic terpenes มี 5 แบบ สารที่เป็นตัวแทนในแต่ละแบบได้ ไพนีน (pinene) แคมฟีน (camphene) สาร bicyclic terpenes ที่สำคัญที่สุด ได้แก่ แอลฟา- ไพนีนและเบต้า- ๗ ไพนีน สูตรโครงสร้างของสารโมโนเทอร์พีนส์ (รูปที่ 2.3)



myrcene ocimene α- terpinene

รูปที่ 2.3 ตัวอย่างสารโมโนเทอร์พีนส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบเซสควิเทอร์พีนส์เกิดจาก 3 isoprene unit มีโครงสร้าง $C_{15}H_{24}$ มีอยู่เป็นจำนวนมากทำให้ไม่สามารถกำหนดสูตรโครงสร้างโดยทั่วไป สารฟาร์นีซีน (farnesene) อาจจะเป็นสาร acyclic ที่มีสูตรโครงสร้างที่ง่ายที่สุด สารเซสควิเทอร์พีนส์หลายชนิดเป็น bicyclic มีวงแหวน C_6 2 วง หรือมีวงแหวน C_6 และ C_5 อย่างละวง ตัวอย่างที่ชัดเจนได้แก่สาร monocyclic humulene มีวงแหวน C_{11} (รูปที่ 2.4)

β-farnesene α-humulene

รูปที่ 2.4 ตัวอย่างสารเซสควิเทอร์พีนส์

กลุ่มของสารเทอร์พีนส์และอนุพันธ์ของเทอร์พีนส์ ได้แก่

2.1 สาร acyclic monoterpene alcohols และ acyclic sesquiterpene alcohols พบในน้ำมันหอมหลายชนิดและเป็นสารให้กลิ่นสำคัญ เช่น ซิโทรเนลลอน, เจอรานิออล, ลินาลูล และเนอรอล (รูปที่ 2.5)

linalool citronellol

รูปที่ 2.5 ตัวอย่างสาร acyclic terpene alcohol

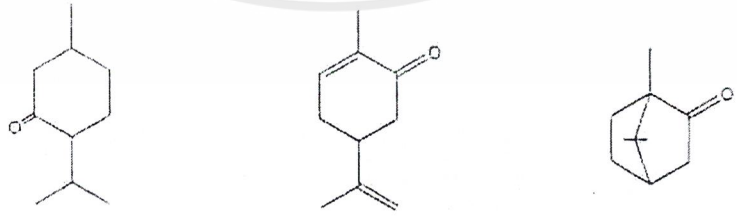
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 acyclic monoterpenes aldehyde และ acyclic monoterpene aldehyde ที่สำคัญที่สุด ได้แก่ ซิทรอลและซิโทรเนลลาล (citronellal) สารทั้ง 2 ชนิดจัดเป็นสารเริ่มต้นสำคัญในการสังเคราะห์สารที่ให้กลิ่นหอมอื่น ๆ (ดังรูป 2.6)

citronellal hydroxycitronellal

รูปที่ 2.6 ตัวอย่างสาร acyclic terpene aldehyde

2.3 cyclic terpene derivatives มีอยู่เป็นจำนวนมากและหลากหลาย สาร cyclic terpene aldehydes มีอยู่ในน้ำมันหอมในปริมาณความเข้มข้นต่ำ สาร cyclic ketones จัดได้ว่ามีความสำคัญมากกว่า สารเมนโทน (menthone) และ คาร์โวน (carvone) จัดเป็นสารปรุงแต่งรสและกลิ่นที่มีความสำคัญในการค้า นอกจากนี้ยังมีสารไซคลิคเซสควิเทอร์พีนอยด์นูทคาโทน (cyclic sesquiterpenoid nootkatone) ซึ่งเป็นสารชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญหรือมีผลต่อกลิ่นของเกรปฟรุต มีสูตรโครงสร้างดังนี้ (รูปที่ 2.7)



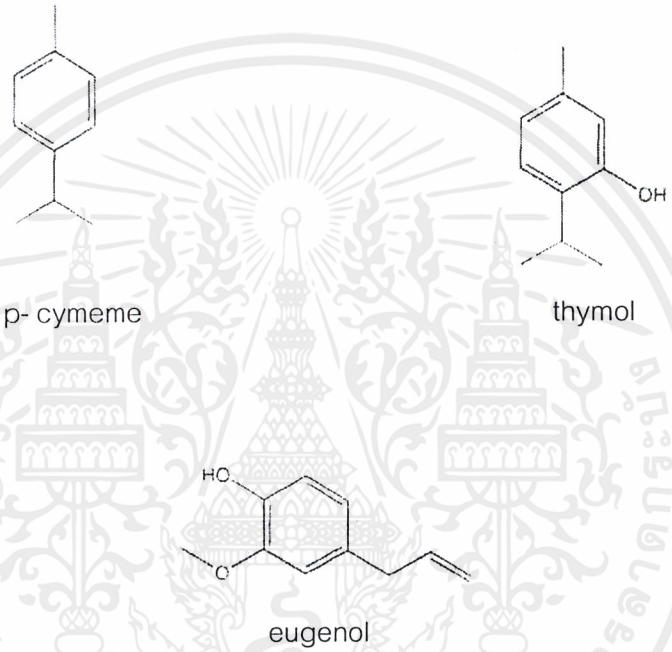
menthone carvone camphor

รูปที่ 2.7 ตัวอย่างของสาร cyclic terpene derivatives

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. **สารอนุพันธ์ของเบนซีน** (Benzene derivatives)

สารไฮโดรคาร์บอนที่มีความสำคัญมากที่สุดที่เปลี่ยนแปลงมาจากเบนซีน ได้แก่ สาร พารา-ไซมีน พบในน้ำมันหอมหลายชนิดและเมื่อเป็นสารบริสุทธิ์มีกลิ่นส้มอ่อนๆ สารเบนซีนอยด์แอลกอฮอล์และแอลดีไฮด์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในน้ำมันหอมได้แก่ เฟนนิลเอทธิลแอลกอฮอล์ ซินนามิคแอลกอฮอล์ซินนามิคแอลดีไฮด์และเฟนนิลอะซีทัลดีไฮด์ สารคีโทนส์ที่มีกลิ่นหอมส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในการปรุงแต่งกลิ่น และรสในอุตสาหกรรมเป็นสารสังเคราะห์ (รูปที่ 2.8)



p- cymeme thymol

eugenol

รูปที่ 2.8 ตัวอย่างสารเบนซีนอยด์ที่มีกลิ่นหอม

4. **สารอื่น ๆ** เช่น สารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบซึ่งมีผลต่อกลิ่นของน้ำมันหอม สารที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบพบน้อยมากในน้ำมันหอมแต่พบทั่วไปในกลิ่นที่ได้จากสัตว์ ตัวอย่างของสารที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบพบในน้ำมันหอมที่ได้จากกระเทียม,มัสตาร์ด (รูปที่ 2.9)

methylanthranilate indole

รูปที่ 2.9 ตัวอย่างสารที่มีกลิ่นหอมตัวอื่น ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โหระพาประกอบด้วยน้ำมันทั้งชนิดที่เป็นน้ำมันหอมระเหยและไม่หอมระเหย โปรตีน เซลลูโลส รงควัตถุและแร่ธาตุต่าง ๆ สำหรับน้ำมันหอมระเหยมีสีเหลืองและสีเขียวอ่อน มีกลิ่นหอม สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญได้แก่ methyl chavicol และ d-linalool น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากโหระพามี 4 แบบ ได้แก่

1. European type กลั่นจาก *O. basilicum* เจริญในยุโรปและอเมริกา เรียกโดยทั่วไปว่าเป็น oil of sweet basil ประกอบด้วยสารที่สำคัญคือ methyl chavicol นอกจากนี้ยังมี linalool อีกด้วย แต่ไม่มี camphor น้ำมันชนิดนี้มีราคาสูงมากเพราะกลิ่นหอม

2. Reunion type กลั่นจากโหระพาที่ได้จาก Reunion Island แต่ในปัจจุบันผลิตในเกาะโคโมโร สาธารณรัฐมาลากาซีและเกาะซีเชลล์ น้ำมันประกอบด้วย methyl chavicol และ camphor แต่ไม่มี linalool

3. Methyl cinnamate type กลั่นจากโหระพาที่ได้จากบัลกาเรีย ซิซิลี อียิปต์ อินเดีย และไฮติ น้ำมันประกอบด้วย methyl chavicol, linalool และ methyl cinnamate

4. Eugenol type กลั่นจากโหระพาที่ได้จากชวา เกาะซีเชลล์ ซามัวและรัสเซีย ประกอบด้วย eugenol เป็นองค์ประกอบหลัก

นอกจากนี้ยังมีน้ำมันหอมระเหยของโหระพาที่กลั่นจาก *O. basilicum* L. ที่ปลูกในเวอร์จิเนีย สหรัฐอเมริกา พบว่ามีองค์ประกอบของน้ำมันคล้ายกับ European sweet basil oil กล่าวคือ ประกอบด้วย d-limonene, cineol, l-linalool, methyl chavicol, eugenol และ sesquiterpene ซึ่งสารเคมีดังกล่าวนี้จะพบว่ามี l-linalool มากกว่าครึ่งหนึ่งของสารประกอบต่างๆ ที่พบในน้ำมันหอมระเหยและมี methyl chavicol ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ส่วน cineol, eugenol และ sesquiterpene มีจำนวนเล็กน้อย วีระพงษ์ โพธิ์เมือง, 2517 พบว่า สารประกอบทางเคมีที่พบในน้ำมันหอมระเหยของโหระพาจากประเทศไทยประกอบด้วยสารเคมีต่างๆ ดังนี้

α - pinene	0.2	เปอร์เซ็นต์
camphene	0.1	เปอร์เซ็นต์
β - pinene	0.3	เปอร์เซ็นต์
sabinene	0.1	เปอร์เซ็นต์
myrcene	0.5	เปอร์เซ็นต์
limonene	0.1	เปอร์เซ็นต์
1,8 cineol	2.0	เปอร์เซ็นต์
γ - terpinene	0.1	เปอร์เซ็นต์
tran – ocimene	2.6	เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3 – octanone	เล็กน้อย	
terpinolene	0.1	เปอร์เซ็นต์
trans – ocimene oxide	0.1	เปอร์เซ็นต์
linalool	0.5	เปอร์เซ็นต์
camphor	0.3	เปอร์เซ็นต์
trans α -bergamotene and bornyl acetate	1.5	เปอร์เซ็นต์
β - elamene	0.5	เปอร์เซ็นต์
terpinene – 4 –ol	0.1	เปอร์เซ็นต์
methyl chavicol and α - humulene	88.2	เปอร์เซ็นต์
α - terpineol, geraniol and germacrene D	0.8	เปอร์เซ็นต์
γ -cadinene	0.4	เปอร์เซ็นต์
caryophyllene oxide and methyl eugenol	0.3	เปอร์เซ็นต์
unidentified constituents	1.1	เปอร์เซ็นต์

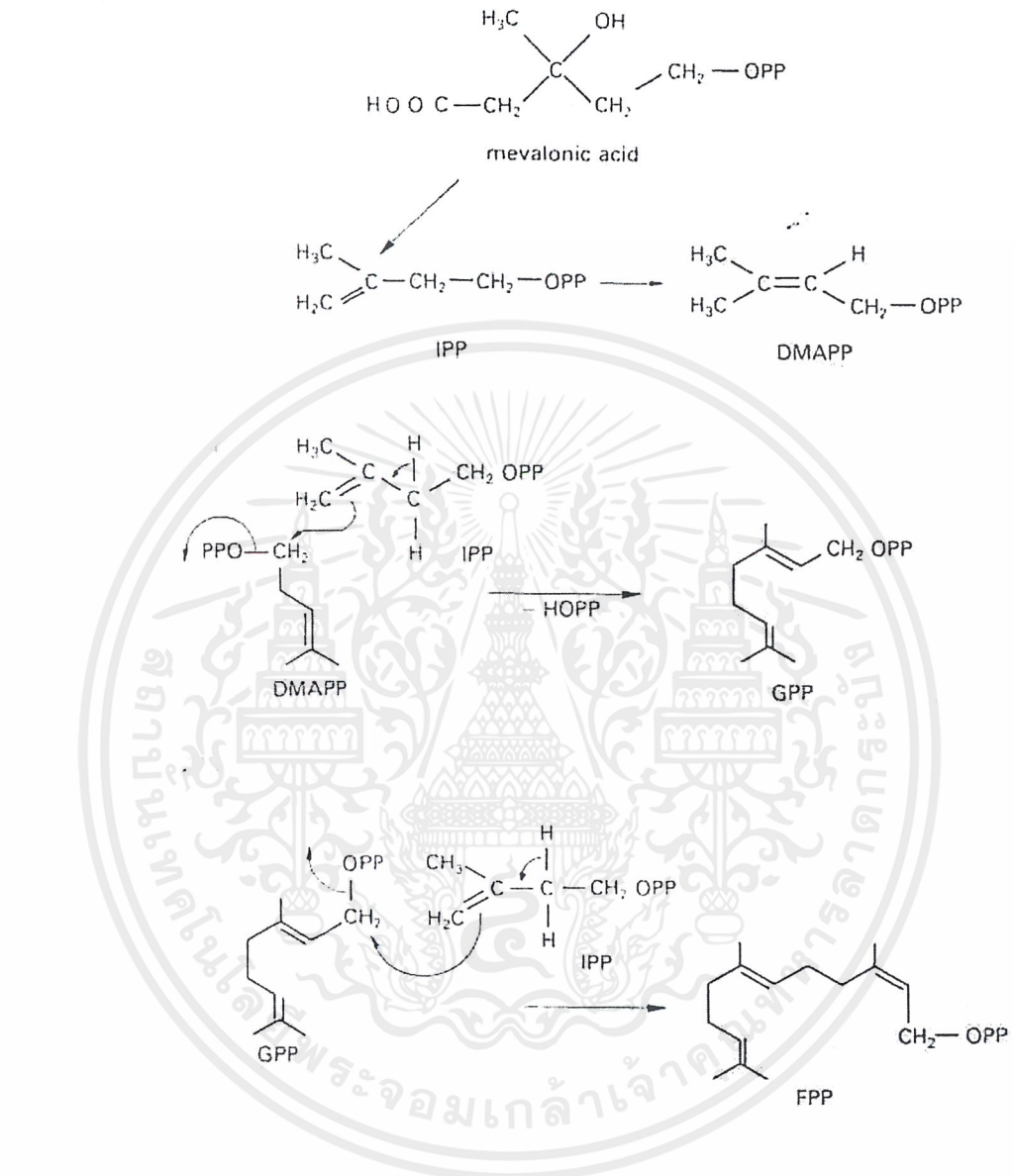
สำหรับ methyl chavicol ซึ่งพบมากในโหระพานั้น มีสูตรโครงสร้างทั่วไปเป็น $C_{10}H_{12}O$ สารนี้เป็นพวก phenylpropenes หรือสารอนุพันธ์ของเบนซีน และเป็น isomer ของ anethole ซึ่งเป็นของเหลวที่ไม่มีสี มีกลิ่นคล้ายกับ anise

2.3 วิถีการสังเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอม

การสังเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอม แบ่งออกเป็น 2 วิถี (Robert และ Peter, 1993) คือ

1. **วิถี** mevalonic acid เป็นวิถีที่ทำให้เกิดสารกลุ่ม monoterpenes และ sesquiterpenes โดยมีสาร mevalonic acid เป็นสารตัวกลางที่ประกอบด้วยคาร์บอน 6 อะตอม เกิดจาก acetyl coenzyme A 3 โมเลกุล สารดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนเป็นสารที่มีโครงสร้าง 5 อะตอม ได้เป็นสารตัวกลาง isopentenyl pyrophosphate (IPP) และเปลี่ยนไปเป็น 3,3-dimethylallylpyrophosphate (DMAPP) สาร IPP 1 โมเลกุล จะรวมกับ DMAPP 1 โมเลกุลโดยอาศัยเอนไซม์ geranyl pyrophosphate sythase ได้เป็น geranyl pyrophosphate (GPP) ซึ่งเป็นสาร monoterpene ตัวแรก และเกิดปฏิกิริยาการเติมสาร IPP ให้กับ GPP ได้เป็นสาร farnesyl pyrophosphate (FPP) ซึ่งเป็นสารประกอบ sesquiterpene ที่มีคาร์บอน 15 อะตอม (รูปที่ 2.10)

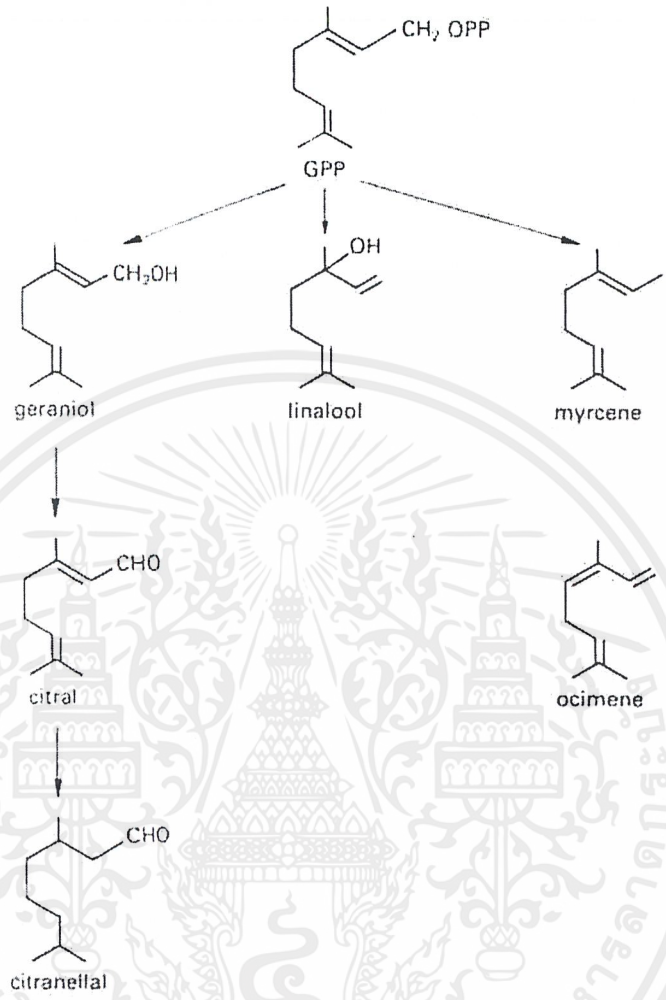
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 การสังเคราะห์สาร FPP จาก mevalonic acid

สาร GPP จะถูกดึงเอาโมเลกุล pyrophosphate ออกเกิดเป็นสาร acyclic monoterpenes เช่น geraniol, linalool , ocimeme และ myrcene จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยารีดักชันหรือออกซิเดชันต่อไปได้ สาร citral และ citranellal ตามลำดับ (ดังรูป 2.11)

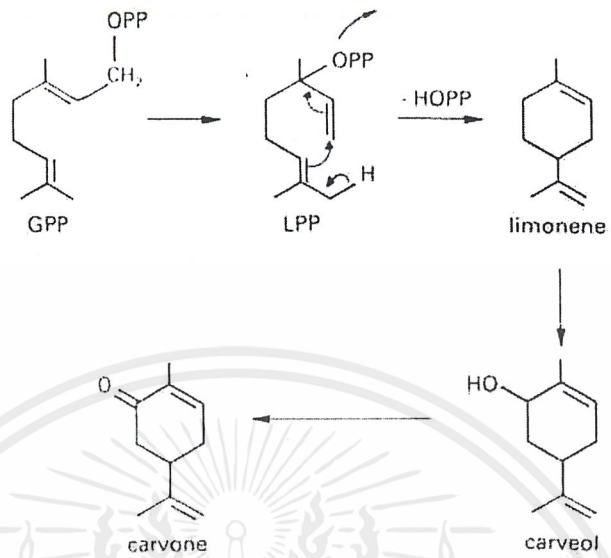
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.11 การสังเคราะห์สาร acyclic monoterpenes จาก GPP

ส่วนการสังเคราะห์สาร cyclic monoterpenes เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ GPP ไปเป็น สาร linalyl pyrophosphate (LPP) และเกิดปฏิกิริยา cyclization ซึ่งเร่งโดยเอนไซม์ prenylcyclase ได้เป็น limonene (ดังรูป 2.12) จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อไปได้สาร carveol และ carvone ตามลำดับ

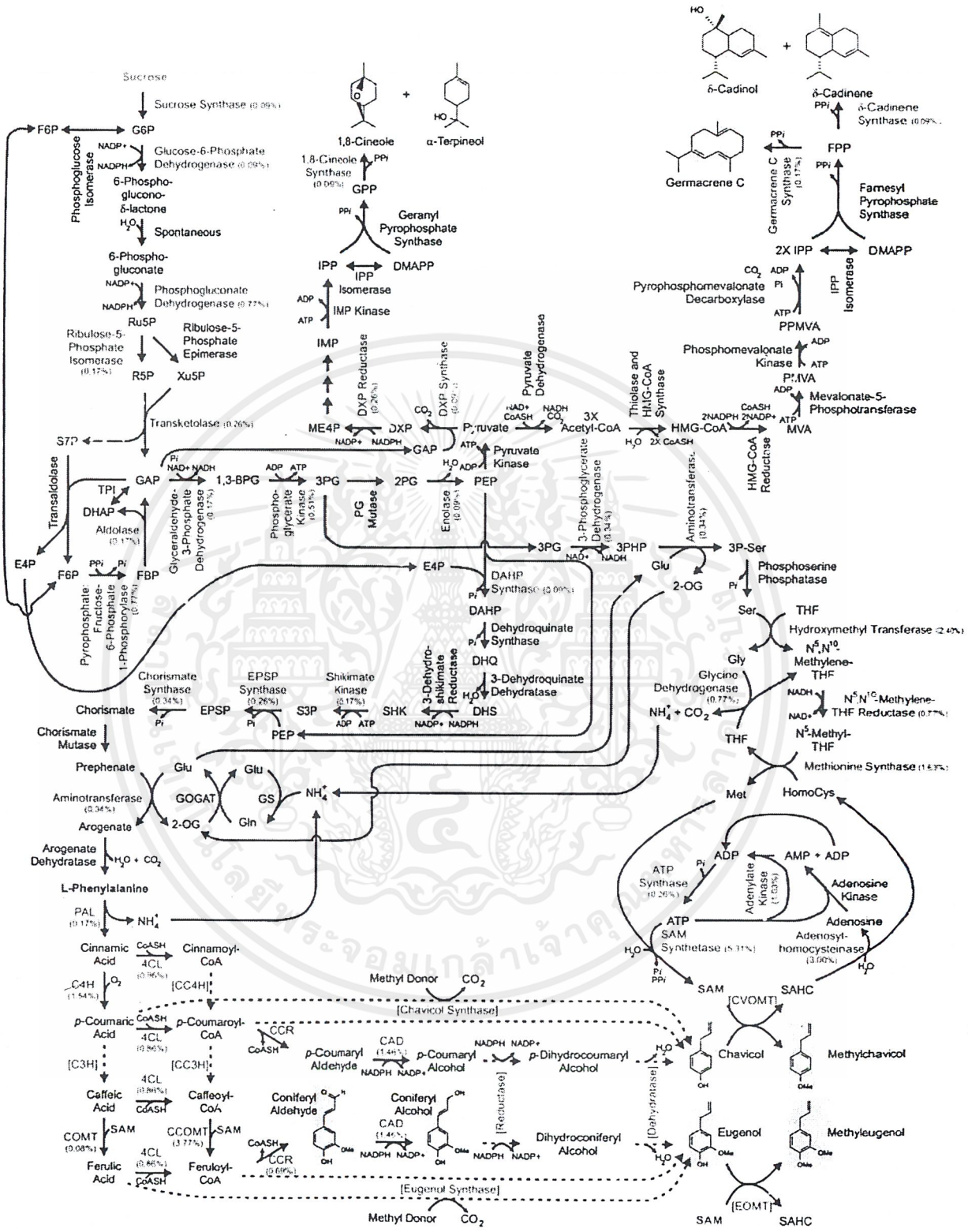
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.12 การสังเคราะห์สาร monocyclic monoterpenes จาก GPP

2. **วิถี** shikimic acid เป็นวิถีที่ทำให้เกิดสารกลุ่ม phenylpropenes พวก aromatic amino acid โดยมี phenylalanine เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์ ในขั้นตอนแรกจะเกิดการดึงหมู่ amino ของ Phenylalanine ไปให้กับ cinnamic acid โดยอาศัยเอนไซม์ Phe ammonia lyase (PAL) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญในเมแทบอลิซึมสารทุติยภูมิ สาร cinnamic acid จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างต่อไปซึ่งยังไม่ทราบวิถีที่แน่ชัด และนำไปสู่การสร้างสารกลุ่ม alkaloids เช่น morphine, berberine, tubocurarine รวมทั้งสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิจำนวนมาก รวมทั้ง lignans, flavonoids และ coumarins (รูปที่ 2.13)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.13 วิถีการสังเคราะห์ phenylpropene

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร phenylpropenes จะถูกสร้างและสะสมไว้ที่ capitate glands และ termed peltate ตามลำดับ ซึ่งเป็น glandular trichomes ที่มีลักษณะเป็นขนอยู่ที่ผิวใบและลำต้น เป็นต่อมน้ำมันที่มีโครงสร้างซับซ้อนอยู่ในเนื้อเยื่อ palisade ประกอบด้วยเซลล์ที่ทำหน้าที่หลั่งน้ำมันหอมขนาดใหญ่อยู่ใกล้กับท่อลำเลียงน้ำและอาหาร (รูปที่ 2.14) (David *et al.*, 2001)

รูปที่ 2.14 ลักษณะของ glandular trichomes

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.4 **ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

1. **เพื่อการผลิตต้นพืชปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว** โดยการอาศัยสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิดสามารถเพิ่มจำนวนต้นเป็นทวีคูณ

2. **เพื่อการผลิตพืชที่ปราศจากโรค** ปัญหาสำคัญประการหนึ่งของการผลิตพืชก็คือ โรคซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไมโคพลาสมาและ ไวรัส ที่ติดมากับเมล็ดหรือส่วนขยายพันธุ์ต่างๆ ต้นพืชที่มีการปนเปื้อนของเชื้อโรคเหล่านี้หากไม่แสดงอาการให้เห็นและทราบได้ต่อเมื่อเกิดอาการเป็นโรคบนต้นพืชที่ปลูกไปแล้ว เมื่อถึงเวลานั้นก็ยากที่จะแก้ไขหรือป้องกันนอกจากกำจัดหรือทำลายพืชนั้นทิ้งไป ต้นพืชที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปราศจากเชื้อและราเป็นต้นต้นแรก เพราะหากมีจุลภาคของเชื้อเหล่านี้ตกลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อก็จะเกิดการปนเปื้อนของเชื้อ(contamination) เพราะทั้งเชื้อราและแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหาร ปรากฏเป็นกลุ่มโคโลนีที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า เราจึงสามารถขจัดออกได้ ฉะนั้นก่อนการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อจะต้องมีการคัดเลือกและตรวจสอบเนื้อเยื่อจนแน่ใจว่าปลอดจากเชื้อไวรัส ชิ้นส่วนของพืชที่ปลอดจากเชื้อไวรัสมากที่สุด คือ epical meristem ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่อยู่บริเวณปลายยอดของลำต้น และส่วนของเนื้อเยื่อคัพภะ (embryonic tissue) ที่อยู่ในเมล็ด เนื่องจากอนุภาคไวรัส สามารถเคลื่อนย้ายได้ทางท่ออาหาร และท่อน้ำ แต่เนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีส่วนของท่อลำเลียง (vascular tissues) ซึ่งได้แก่ท่อน้ำ (xylem) และท่ออาหาร (phloem) ที่ติดกับส่วนอื่นๆ ของต้นพืช

3. **เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช** โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation) โดยใช้รังสี สารเคมี การตัดต่อยีน (DNA recombination) และการย้ายยีน (gene transformation) แล้วคัดเลือกเอาสายพันธุ์ดีไว้

4. **เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน** (resistant plants) เราสามารถที่ชักนำให้เกิดความต้านทานขึ้นในต้นพืช โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเงื่อนไขต่างๆ เช่น การสร้างสายพันธุ์ต้านทานต่อพิษของโรค ต้านทานแมลง ต้านทานต่อยากำจัดวัชพืช

5. **เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ทนทาน** (tolerant plants) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเราสามารถที่จะคัดเลือกสายพันธุ์ทนทานได้จากการจัดเงื่อนไขของอาหารและสภาพแวดล้อมเช่น การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็มจากการเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การคัดเลือกสายพันธุ์ทนดินเปรี้ยวจากการเลี้ยงในอาหารที่มีสภาพเป็นกรด การคัดเลือกสายพันธุ์ทนร้อนโดยเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

43965

6. **เพื่อการผลิตยาและสารเคมีจากพืช** พืชบางชนิดให้สารที่มีคุณสมบัติเป็นยาหรือสารเคมีที่มีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม แต่ในบางกรณีเนื้อเยื่อที่นำมาสกัดดังกล่าวมีปริมาณที่น้อยมาก ดังนั้นจึงต้องใช้วิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มจำนวน และชักนำให้มีการสังเคราะห์สารที่ต้องการในปริมาณมากขึ้น

7. **เพื่อการศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์** ต้นพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารสังเคราะห์สามารถที่ติดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย ทั้งในระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และพืชทั้งต้น เช่น การศึกษาการตอบสนองของเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่อสารเคมีป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช สารเคมีป้องกันกำจัดวัชพืช สารควบคุมการเจริญเติบโต และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเซล์หรือเนื้อเยื่อที่เกิดการกลายพันธุ์ เป็นต้น เนื่องจากการควบคุมตัวแปรต่างๆ ทำได้ดีกว่าในสภาพการปลูกปกติ

8. **เพื่อการเก็บรักษาพันธุ์พืช** เราสามารถเก็บพืชที่หายากและกำลังจะสูญพันธุ์ไว้ในสภาพหลอดทดลอง โดยเลี้ยงไว้ในอาหารที่มีส่วนผสมของสารบางชนิดที่มีผลต่อการชะลอการเจริญเติบโต หรือมีสารที่มทำให้เกิดสภาพขาดน้ำ (water stress) เพื่อชักนำให้พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามากๆ เป็นการประหยัดเวลา แรงงาน ค่าใช้จ่าย และสามารถคงสภาพและมีชีวิตได้ยาวนาน อีกวิธีที่ใช้ คือ เก็บรักษาเซลล์หรือเนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำถึง –196 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการปลูกหรือเพิ่มปริมาณ ก็นำมาเลี้ยงในอาหารสูตรปกติของพืชชนิดนั้นๆ

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จะประกอบด้วยธาตุอาหารต่างๆ ที่พืชต้องการอย่างครบถ้วน ซึ่งเป็นสารประกอบพวกอนินทรีย์ (inorganic compound) และพวกสารประกอบอินทรีย์ (organic compound) เนื่องจากสารประกอบที่กล่าวมาเป็นสารกลุ่มใหญ่ในที่นี้จะจัดแบ่งเป็นกลุ่มย่อยๆ ดังนี้

1. **ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์** (inorganic substances) ประกอบด้วยธาตุต่างๆดังนี้

1.1 ธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณมาก (macro-nutrients) ได้แก่ C, H, O, N, P, K, Ca, Mg และ S

1.2 ธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณน้อย (micro-nutrients) ได้แก่ Fe, Mn, Cu, Zn, B, Cl และ Mo

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. **ธาตุอาหารพวกอินทรีย์** (organic substances) ประกอบด้วย

2.1 **วิตามิน** (vitamins) วิตามินที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ thaimine, nicotinic acid, pyridoxine, inositol, biotin, panthothenic acid, folic acid, choline chloride, riboflavin และ ascorbic acid

2.2 ฮอร์โมน และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant hormone and plant growth regulators) ได้แก่

2.2.1 สารในกลุ่มออกซิน (auxins) เช่น indole-3-acetic acid (IAA), naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacrtic acid (2,4-D) เป็นต้น

2.2.2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinins) เช่น N_6-Benzyladeni(BA), kinetin, N_6-isopentenyl adenine (2iP) เป็นต้น

2.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ เช่น gibeberellic acid (GA), paclobutrazol, abscisic acid (ABA), daminozide เป็นต้น

2.3 สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (carbon source) ได้แก่ สารประกอบพวกน้ำตาลต่างๆ เช่น glucose, sucrose, fructose, saccharose และ mannitol

2.4 **กรดอะมิโน** (amino acids) ได้แก่ glutamine, asparagine, adenine, glycine และ casein hydrolysate

2.5 **สารประกอบอินทรีย์อื่นๆ** ส่วนใหญ่ได้จากธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว (coconut milk) สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) น้ำต้มมันฝรั่ง น้ำคั้นมะเขือเทศ (tomato juice) กล้วยหอมบด และจากมอลท์สกัด (malt extract)

การเพาะเลี้ยงแคลลัส

แคลลัส (callus) หมายถึงกลุ่มเซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma) เพียงอย่างเดียว มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอลจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ (chiorophylls) สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ (carotenoids) ฟลาโวทีนอยด์ (flavonoids) และสีม่วงจากแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสง แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่นเรียกว่า compact callus แต่ถ้าเกาะกันอย่างหลวมๆ เรียกว่า friable callus

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมชิ้นส่วนพืชที่ใช้เพาะเลี้ยง

ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ควรมีสภาพที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส คือ ควรเป็นชิ้นส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญจากเนื้อเยื่อที่มีอายุน้อย ในกรณีของเนื้อเยื่อพิเศษ เช่น แคมเบียม (cambium) เอ็นโดสเปอร์ม (endosperm) ไส้หรือแกนลำต้น (pith) นั้นการเพิ่มจำนวนแคลลัสขึ้นอยู่กับช่วงเวลาของการแยกเนื้อเยื่อมาใช้ ในทางปฏิบัตินิยมใช้เนื้อเยื่อจากเมล็ดที่เพาะให้งอกในสภาพปลอดเชื้อให้เกิดส่วนของราก ยอด และใบอ่อน สาเหตุที่นิยมใช้เนื้อเยื่อจากเมล็ด คือ

1. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยตรงโดยเพาะเมล็ดทั้งเมล็ดบนอาหารวุ้นที่เติมสารกระตุ้นการเจริญเติบโต

2. เมื่อเพาะเมล็ดให้งอกในอาหารวุ้นที่ปราศจาก หรือมีสารกระตุ้นการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย จะชักนำให้เกิดส่วนของราก ยอด และใบที่ปลอดเชื้อ ใช้เป็นชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงแคลลัสต่อไป และสามารถแยกเอาเนื้อเยื่อส่วนของรากและปลายยอด ออกมาจากเมล็ดได้โดยตรง

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส

1. **ขนาดและรูปร่าง** ของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้เลี้ยงต้องไม่เล็กจนเกินไป คือ มี cirtical minimum size ถ้าชิ้นส่วนของพืชมีขนาดเล็กกว่านี้จะไม่สามารถชักนำการเกิดแคลลัส

2. **สารควบคุมการเจริญเติบโต** โดยเฉพาะออกซินและไซโตไคนินซึ่งสัดส่วนของฮอร์โมนทั้งสองกลุ่มนี้มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ ในกรณีที่สัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง (ออกซิน > ไซโตไคนิน) แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนนี้ต่ำ (ออกซิน < ไซโตไคนิน) แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้น แต่ถ้าสัดส่วนนี้สมดุล (ออกซิน = ไซโตไคนิน) จะพัฒนาไปเป็นแคลลัสต่อไป ความเข้มข้น ปริมาณ และสัดส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสจะขึ้นอยู่กับชนิดพืช ชนิดชิ้นส่วน และระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้

3. **ธาตุอาหาร** นอกจากธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบหลักทั่วๆ ไปของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว อาหารเสริมพวกอะมิโน เช่น กลูตามิน แอสปาติน อาร์จินิน พิวรีน และไพริมิดีน สารพวกเคซินไฮโดรไลเซท สารสกัดจากมอลท์ ยีสต์ และน้ำมะพร้าวก็มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสในพืชบางชนิดด้วย

4. **แหล่งของคาร์บอน** ที่สำคัญได้แก่ น้ำตาลซูโครส และแซคคาโรส ความเข้มข้น 2-4 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. **ปัจจัยสิ่งแวดล้อม** โดยเฉพาะแสง ซึ่งต้องการความเข้มต่ำหรือไม่ใช้แสงเลย (เลี้ยงในที่มืด) อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังต้องการออกซิเจนเพื่อการหายใจด้วย

6. **สภาพอาหาร** แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งมักเจริญเติบโตได้น้อยและช้ากว่าในอาหารเหลวเนื่องจากมีพื้นที่สัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่า และตำแหน่งที่ชิ้นส่วนแคลลัสสัมผัสกับอาหาร จะมีสารที่เป็นของเสียจากเมตาบอลิซึม (metabolic waste) ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงแคลลัส

1. **การขยายพันธุ์** (micropropagation) โดยการชักนำให้เกิดเป็นต้นที่ปราศจากโรคจำนวนมาก

2. **การผลิตโปรโตพลาส** (protoplasts) แคลลัสเหมาะอย่างยิ่งในการนำไปย่อยผนังเซลล์ เนื่องจากอยู่ในสภาพที่ปลอดเชื้อและเซลล์ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา

3. **การผลิตสารเคมีที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึม** (secondary metabolites) ซึ่งบางชนิดสามารถนำไปใช้ในทางการแพทย์และอุตาหกรรมได้

4. **สามารถผลิตพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด** (polyploids) โดยใช้สารโคลซิซินชักนำ

5. **การผลิตพืชทนทานหรือพืชต้านทาน** เช่น ทนทานต่อสภาพดินเค็ม ดินเปรี้ยว อากาศร้อนและอากาศหนาว หรือต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ต้านทานต่อโรคและสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส

6. **การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรม** (cryopreservation)

2.5 วิธีการผลิตน้ำมันหอมระเหย

วิธีการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีอยู่ 4 แบบ คือ

1. **การใช้ไขมันเป็นตัวดูดซับน้ำมันหอม**

เช่น เทคนิคเอ็นฟลูเรจ (enflurage) ใช้ในการดักจับกลิ่นหอมที่แท้จริงของดอกไม้ที่มีความละเอียดอ่อน โดยมีการวางดอกไม้ในถาดหนา 1 ชั้นที่มีการเคลือบไขไว้บาง ๆ ทำหน้าที่ดูดซับสารระเหยจากดอก การดูดซับใช้เวลานาน 1-3 วัน ก่อนที่จะนำดอกไม้ชุดใหม่มาวางแทนจนกว่าไขจะอิ่มตัว ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า ปอมเมด (pomade) สามารถนำไปใช้ประโยชน์โดยตรงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตเครื่องสำอาง แต่ส่วนมากนำไปล้างด้วยแอลกอฮอล์ของเหลวที่ได้เรียกว่า extrait หรือ absolute de pomade

2. การสกัดโดยใช้สารที่เป็นตัวทำละลาย

หลักการพื้นฐานของการสกัดโดยใช้สารที่เป็นตัวทำละลายไม่ซับซ้อน นำชิ้นส่วนสดของพืชที่จะสกัด เช่น ดอกหรือใบที่หั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก ใส่ในหม้อที่ใช้สกัด เติมสารละลายบริสุทธิ์ให้ซึมซับทั่วทุกส่วนของพืชและละลายสารที่ให้ความหอมออกมารวมทั้งไข อัลบูมินและสารสีต่าง ๆ หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไประเหยโดยกลั่นที่อุณหภูมิต่ำภายใต้ความดันบางส่วน ส่วนที่เหลืออยู่เรียกว่า คอนกรีต (concrete) นำไปล้างด้วยแอลกอฮอล์หลายครั้งเพื่อล้างเอาส่วนที่เป็นไขและสารเจือปนอื่นออก ส่วนที่ได้เรียกว่า แอบโซลูท (absolute) วิธีการสกัดดังกล่าวทำซ้ำกันหลายครั้งจนกว่าจะสกัดสารให้ความหอมออกมาได้หมด ในกรณีของเครื่องเทศใช้วิธีการคล้าย ๆ กัน สารสกัดที่ได้มีสารหอม ไข เรซิน และสารสีรวมกันเรียกว่า โอลีโอเรซิน (oleresins)

สารที่นำมาใช้เป็นตัวทำละลาย ควรเป็นสารที่ละลายสารที่มีกลิ่นหอมอย่างรวดเร็วและละลายสารเจือปน เช่น ไข สารสี และอัลบูมินออกมาน้อยที่สุด ต้องไม่ดูดซับน้ำเพราะจะทำให้ยากต่อการเอาออกจากส่วนที่สกัดได้ สารที่มีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้ได้แก่ ปิโตรเลียมอีเธอร์ เบนซีนและแอลกอฮอล์ การสกัดเครื่องเทศนิยมใช้เฮกเซนและไดคลอโรมีเทน สารที่เป็นตัวทำละลายที่ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบันได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์เหลวที่อยู่ในรูป supercritical form

3. การบีบและการคั้น

การบีบและการคั้นใช้สำหรับสกัดน้ำมันผิวส้ม เช่น จากผลเกรปฟรุต เลมอน มะนาว ส้ม การสกัดน้ำมันหอมจากผลส้มมีการบีบที่อุณหภูมิต่ำและมีการกลั่นภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูงไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส เพื่อให้มีการสลายตัวน้อยที่สุด

4. การกลั่น

การกลั่นจำแนกออกเป็น 3 แบบ คือ การต้ม การกลั่นด้วยไอน้ำ และการกลั่นที่อุณหภูมิและความดันไอน้ำต่ำ การต้มจะทำให้ได้ผลผลิตน้ำมันหอมต่ำ ชิ้นส่วนของพืชเกิดการไหม้และเกิดการสลายตัวของสารประกอบบางชนิดที่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับความร้อน ทำให้เกิดกลิ่นหม้อต้ม (still odours) การกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ เป็นวิธีการที่มีทั้งการต้มน้ำและไอน้ำ วิธีการนี้มีการใส่ตะแกรงเหล็กเหนือระดับน้ำสำหรับวางวัสดุที่นำมาสกัด ทำให้ไม่เกิดการสัมผัสน้ำโดยตรง มีการใช้สกัดน้ำมันหอมจากพืชหลายชนิด เช่น ลาเวนเดอร์ไทม์ (thyme) และเปปเปอร์มินต์ (peppermint) (พีรศักดิ์, 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอม

ในการวิเคราะห์หาปริมาณ และองค์ประกอบของสารโดยใช้วิธีโครมาโตกราฟี (chromatography) ซึ่งเป็นวิธีการแยกสารบริสุทธิ์แต่ละตัวออกจากกัน โดยใช้สารผสมเป็นเฟสคงที่ และมีเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวพาสารต่างๆ ออกจากเฟสคงนี้ สารที่อยู่ในลักษณะของผสมจะเคลื่อนที่ไปด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกันตามทิศทางของสารที่เป็นตัวพา การเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกันเนื่องจากเฟสคงที่กับสารผสม เกิดการกระทำต่อกันแบบใดแบบหนึ่งหรือหลายแบบปนกัน จึงทำให้สารแยกออกจากกันได้

การจำแนกชนิดของโครมาโตกราฟีตามกลไกของการแยกสารแบ่งได้ 4 แบบ คือ

(1) Adsorption Chromatography

(2) Partition Chromatography

(3) Ion Exchange Chromatography

(4) Exclusion Chromatography

มีรายละเอียด ดังนี้

(1) Adsorption chromatography เป็นการแยกสารออกจากกัน โดยสารที่วิเคราะห์เกิดอันตรกิริยากับผิวหน้าของตัวดูดซับของแข็ง ถ้าสารตัวใดถูกดูดซับบนผิวหน้าของตัวดูดซับของแข็งได้ดีก็จะเคลื่อนตัวได้เร็ว ซึ่งการดูดซับของสารขึ้นอยู่กับความมีขั้วของโมเลกุลที่กระทำกับตัวดูดซับที่ผิวของของแข็ง

ตัวอย่างของโครมาโตกราฟีที่อาศัยหลักการนี้ ได้แก่ โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography; TLC) และโครมาโตกราฟีแบบก๊าซ-ของแข็ง (gas–solid chromatography; GSC)

โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง เป็นการแยกสารโดยใช้หลักของกระบวนการดูดซับ ตัวดูดซับเป็นชั้นบางๆบนแผ่นซับพอตเตอร์ เพื่อให้ตัวทำละลายซึมผ่านขึ้นไป สารแต่ละตัวจะเคลื่อนที่ได้เร็วต่างกันทำให้สามารถแยกออกจากกันได้ แผ่นที่แสดงการแยกสารออกจากกัน เรียกว่า โครมาโตแกรม ซึ่งสามารถคำนวณ Rf ได้ดังนี้

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่า Rf จะขึ้นอยู่กับสารที่เป็นตัวดูดซับ, ตัวทำละลายหรือตัวชะ, โครงสร้างของโมเลกุลของสารตัวอย่างและอุณหภูมิ ตัวดูดซับที่นิยมใช้ได้แก่ silica gel, alumina และ cellulose สำหรับตัวทำละลายที่ใช้ขึ้นอยู่กับลักษณะของตัวดูดซับ และสารที่ต้องการแยก ซึ่งสามารถใช้วิเคราะห์เชิงคุณภาพ โดยหาค่า Rf ของสารเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

(2) Partition Chromatography เป็นการแยกสารโดยอาศัยความสามารถในการละลายซึ่งสารแต่ละชนิดจะละลายในตัวทำละลายได้ไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับความมีขั้วของสารนั้น ทำให้อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสารแต่ละตัวไม่เท่ากัน สารที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ได้ดีจะออกมาก่อนสารที่ละลายอยู่ในเฟสคงที่ ตัวอย่างของโครมาโตกราฟีที่อาศัยหลักการนี้ เป็นแบบ ของแข็ง –ของแข็ง, ก๊าซ –ของแข็ง และ ของเหลว –ของเหลว เช่น โครมาโตกราฟีกระดาษ (paper chromatography; PC) และ แก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography; GC)

แก๊สโครมาโตกราฟี เป็นเทคนิคการแยกสารที่สามารถเปลี่ยนสารผสมให้อยู่ในรูปแก๊สได้ที่อุณหภูมิหนึ่ง (ไม่เกิน 450 องศาเซลเซียส) ซึ่งมีเฟสเคลื่อนที่อยู่ในสถานะแก๊ส จะทำหน้าที่ในการพาสารวิเคราะห์ออกมาจากเฟสคงที่โดยไม่เกิดอันตรกิริยากับสารวิเคราะห์ จึงเรียกเฟสเคลื่อนที่ว่า แก๊สพา (carrier gas)

แก๊สโครมาโตกราฟีแบ่งออกเป็น 2 วิธี

1) โครมาโตกราฟีแบบแก๊ส –ของแข็ง (gas –solid chromatography; GSC) วิธีนี้ใช้เฟสคงที่ที่มีสถานะเป็นของแข็งที่สามารถดูดซับ (adsorption) นิยมใช้แยกสารโมเลกุลเล็กๆ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ มีเทน ฯลฯ คอลัมน์ที่ใช้มักบรรจุด้วย active solids เช่น molecular sieves หรือ porous polymers, silica gel และ alumina เป็นต้น

2) โครมาโตกราฟีแบบแก๊ส –ของเหลว (gas –liquid chromatography) วิธีนี้ใช้เฟสคงที่ที่มีสถานะเป็นของเหลว ซึ่งจะเคลือบหรือเกิดพันธะบนอนุภาคของแข็งเฉื่อย หรือผิวภายในท่อขนาดเล็ก เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันมากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ของแก๊สโครมาโตกราฟีทั้งหมด

การแยกสารจะประสบความสำเร็จได้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบที่สำคัญ 2 ประการคือ

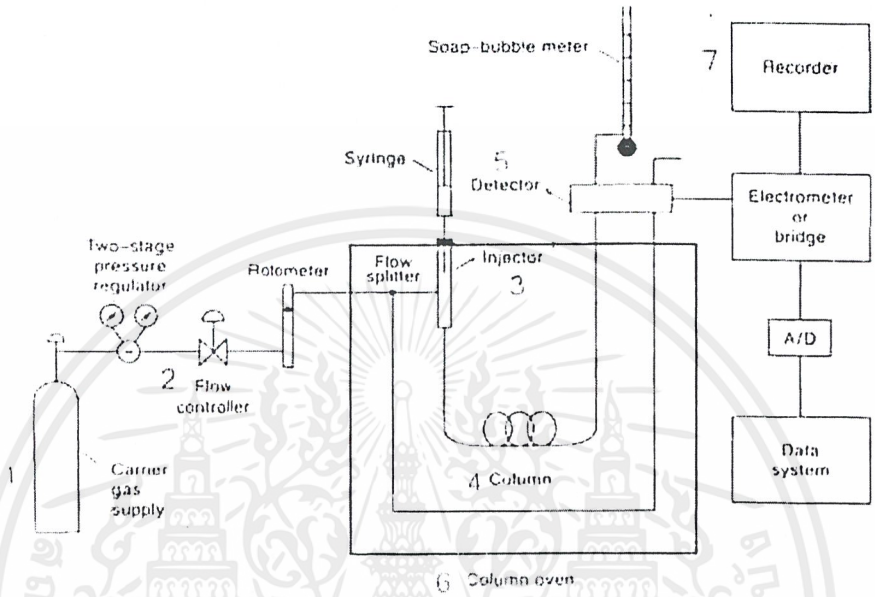
1. ขึ้นอยู่กับสัดส่วน ขนาด และวิธีการบรรจุสารที่บรรจุเข้าไปในคอลัมน์

2. resolution คือการแยกสารผสมตัวอย่างออกจากกันอย่างสมบูรณ์ ซึ่งขึ้นอยู่กับการเลือกคอลัมน์ที่เหมาะสม การควบคุมสภาวะและขนาดของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าเครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องค์ประกอบพื้นฐานของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ประกอบด้วยส่วนสำคัญ ดังรูปที่ 2.15



รูปที่ 2.15 : องค์ประกอบพื้นฐานของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

1. **แก๊สตัวพา** (carrier gas)

ส่วนใหญ่เป็นแก๊สเฉื่อยที่มีความบริสุทธ์สูงที่ใช้สำหรับพาไอของสารตัวอย่างผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ และออกไปสู่ดีเทคเตอร์ โดยต้องควบคุมอัตราการไหล (flow rate) ให้คงที่เสมอ แก๊สพาที่ใช้โดยทั่วไป ได้แก่ ไนโตรเจน ฮีเลียม หรือไฮโดรเจน ที่ต้องผ่านกระบวนการกำจัดความชื้นและออกซิเจนก่อนเข้าสู่คอลัมน์ด้วย

2. **ส่วนที่ใช้ควบคุมการไหลของแก๊สต่าง ๆ** (flow controller)

3. **ส่วนที่ใช้ฉีดสารตัวอย่างเข้าไป** (injection port)

ลักษณะการฉีดสารเข้าสู่เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีจะขึ้นอยู่กับสถานะของสารที่วิเคราะห์และชนิดของคอลัมน์ที่ใช้ เช่น ถ้าสารที่วิเคราะห์เป็นของเหลว สามารถฉีดเข้าโดยตรงหรือทำให้เป็นสารละลายก่อน สำหรับ pack column ปริมาตรที่ฉีดประมาณ 0.2-2 ไมโครลิตร ส่วน capillary column จะฉีดสารปริมาตร 0.01-1 ไมโครลิตร ต้องมีการให้ความร้อนช่องฉีดสารพอที่จะระเหยสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไป และต้องมีอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิของคอลัมภ์ประมาณ 10 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. **คอลัมน์** (column)

คอลัมน์เป็นส่วนที่สำคัญที่สุดที่ใช้สำหรับแยกสาร คอลัมน์ในเทคนิคแก๊สโครมาโท กราฟีมี 2 ชนิด คือ pack column เป็นคอลัมน์ที่ทำจาก stainless steel หรือแก้ว และ capillary column ทำจาก fuse silica ที่เคลือบ polyimide ไว้ภายนอกเพื่อป้องกันการเปราะง่าย มีการบรรจุหรือเคลือบเฟสคงที่ของเหลวไว้บริเวณผิว ในการแยกสารที่มีจุดเดือดสูง จำเป็นต้องให้ความร้อนกับคอลัมน์เพื่อให้สารตัวอย่างเป็นไอตลอดเวลา คอลัมน์จึงต้องอยู่ในตู้ให้ความร้อน เรียก ตู้อบ (column oven)

สำหรับเฟสคงที่ของเหลวจะต้องเป็นสารที่ระเหยยาก มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง และปฏิกิริยาเคมี เฟสคงที่ที่นิยมใช้เป็นโพลีเมอร์ชนิด polysioxane การเลือกชนิดของเฟสคงที่ต้องพิจารณาจากสภาพขั้วซึ่งสอดคล้องกับสภาพขั้วของสารที่วิเคราะห์ตามหลัก like dissolves like

5. **ดีเทคเตอร์** (detector)

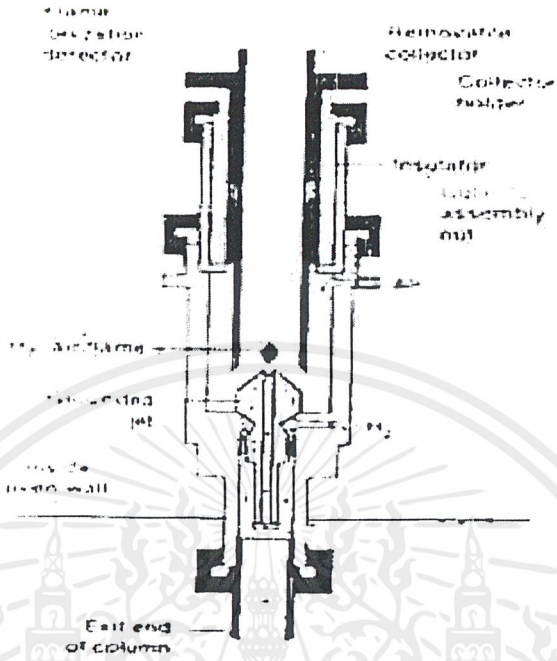
ดีเทคเตอร์ เป็นส่วนที่ใช้สำหรับตรวจวัดสารแต่ละชนิดที่ถูกแยกและพามาโดยแก๊สพา ดีเทคเตอร์ต้องมีความร้อนพอที่จะระเหยสารตัวอย่างที่ผ่านเข้ามาและออกไปไม่ให้ตกค้าง

โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

5.1 Flame Ionization Detector (FID) เป็นเครื่องตรวจวัดทั่วไปสำหรับสารอินทรีย์ ไม่ให้สัญญาณตอบสนองกับแก๊สอนินทรีย์ เช่น CO, CO_2 , NH_3 , N_2 น้ำ อากาศ และสารอนินทรีย์ต่าง ๆ การทำงานของ FID สารอินทรีย์จะถูกเผาไหม้ในเปลวไฟของเครื่องตรวจวัดกลายเป็นไอออนและผลิตอิตรอนออกมา อิเล็กตรอนที่ผลิตได้จะวิ่งเข้ามาที่ collector electrode และเกิดเป็นกระแสขึ้น โดยพบว่าถ้าจำนวนคาร์บอนในสารมีจำนวนมากขึ้น เมื่อกลายเป็นไอออนจะให้อิเล็กตรอนจำนวนมากขึ้นนั่นคือสารที่มีจำนวนคาร์บอนมากจะให้สัญญาณต่อเครื่องตรวจวัด FID มากขึ้น ภาวะต่าง ๆ ของเครื่องตรวจวัด (ดังรูป 2.16)

แก๊สพา	He
แก๊สเชื้อเพลิงและแก๊ส oxidant	H_2 และ O_2
แก๊ส make up (สำหรับคอลัมน์ capillary)	N_2 และ He

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.16 ดีเทคเตอร์ชนิด FID

5.2 Thermal Conductivity Detector (TCD) เป็นเครื่องตรวจวัดทั่วไป การตรวจวัดอาศัยการนำความร้อนของแก๊สที่แตกต่างกัน โดยมีการให้ความร้อนแก่เส้นโลหะอาศัยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน เมื่อสารคนละชนิดเคลื่อนที่ผ่านและนำความร้อนไปด้วยอุณหภูมิของเส้นโลหะจะลดลง โดยจะมีแก๊สพาทำหน้าที่เป็นแก๊สอ้างอิงถ้าสารที่เคลื่อนที่ผ่านเป็นแก๊สพาจะไม่เกิดกระแสขึ้น แต่ถ้ามีสารที่วิเคราะห์อยู่กับแก๊สพาจะทำให้เกิดการเปลี่ยนอุณหภูมิไปจากปกติ จึงเกิดเป็นกระแสขึ้น แก๊สที่นิยมใช้เป็นแก๊สพาใน TCD ได้แก่ He เนื่องจากมีค่าการนำความร้อนได้สูงเมื่อเทียบกับแก๊สชนิดอื่น สำหรับแก๊สชนิดใดที่มีการนำความร้อนดีกว่า He ลักษณะของโครมาโทแกรมที่ได้จะเป็น negative peak

6. **ส่วนที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิ** (temperature controller) หรือ column oven เป็นส่วนที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิให้กับคอลัมน์ ดีเทคเตอร์ และ Injector โดยอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ใช้จะต้องเหมาะสมในการแยกสาร โดยทั่วไปมักจะใช้ที่ค่าเฉลี่ยของจุดเดือดสารที่วิเคราะห์ และต้องน้อยกว่าอุณหภูมิสูงสุดของคอลัมน์ด้วย การควบคุมอุณหภูมิแบ่งเป็น 2 แบบ คือ

6.1 Isothermal temperature อุณหภูมิของคอลัมน์คงที่ตลอดเวลาการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.2 Programmed temperature มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของคอลัมน์ขณะที่ทำการวิเคราะห์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสารที่มีจุดเดือดแตกต่างกันมาก ๆ

7. **ส่วนที่ใช้ประมวลผลและข้อมูลต่าง ๆ** ได้แก่ Integrator, recorder หรือ data processor หรือคอมพิวเตอร์

ในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค แก๊สโครมาโตกราฟี เมื่อเลือกสภาวะต่าง ๆ ของการวิเคราะห์ และจัดสภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี เรียบร้อยแล้ว จึงนำสารตัวอย่างไปฉีดเข้าที่ sample injection port สารจะกลายเป็นไอแล้วถูกพาเข้าไปในคอลัมน์ด้วยแก๊สพาอย่างช้า สารผสมจะถูกแยกออกเป็นส่วน ๆ ที่คอลัมน์นี้ แล้วออกไปสู่ดีเทคเตอร์จะทำให้ได้สัญญาณเกิดขึ้น ซึ่งสามารถเขียนออกมาเป็นโครมาโทแกรมด้วยเครื่อง recorder หรือต่อเข้ากับ printer หรือ integrator ทำให้ผู้วิเคราะห์สามารถทราบองค์ประกอบของสารตัวอย่างได้

(3) Ion Exchange Chromatography เป็นการแยกสารโดยอาศัยการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างไอออนของสารที่วิเคราะห์กับไอออนที่อยู่ที่เฟสคงที่ที่มีประจุเกิดเป็น cation และ anion ที่จับกันแข็งแรง สารที่นิยมใช้เป็นเฟสคงที่ได้แก่ พวกอินทรีย์เรซิน เช่น เรซินของ polystyrine

(4) Exclusion Chromatography เป็นการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดของสารที่วิเคราะห์ ซึ่งใช้เฟสคงที่ที่มีรูพอเหมาะกับขนาดของโมเลกุลที่จะผ่านเข้าไปและออกมาได้ โมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่าขนาดช่องจะสามารถผ่านออกมาได้เร็วกว่าโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ สารที่นิยมใช้เป็นเฟสคงที่ ได้แก่พวก silicate

2.7 เอกสารการวิจัย

การวิจัยภายในประเทศ

ในปี พ.ศ. 2517 วีระพงษ์ โพธิ์เมือง พบว่าสารประกอบทางเคมีที่พบในน้ำมันหอมระเหยของโหระพาจากประเทศไทยประกอบด้วยสารเคมีชนิดต่าง ๆ มากกว่า 22 ชนิด แต่ที่พบในปริมาณสูงคือ methyl chavicol และ alpha- humulene 88.2 เปอร์เซ็นต์ trans- ocimene 2.6 เปอร์เซ็นต์ และ trans- alpha-bergamotene และ bornyl acetate 1.5 เปอร์เซ็นต์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2537 ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปี 2524 บัญญัติ สุขศรีงาม พบว่าโหระพาสามารถยับยั้งการเจริญของ *Micrococcus* sp., *Pediococcus* sp. และ *Proteus vulgaris* ได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นและยับยั้ง *Salmonella typhosa* ได้อีกด้วย นอกจากนั้นยังมีการศึกษาคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ในการไล่ยุงและแมลงวันได้

การวิจัยในต่างประเทศ

Pogany *et al.*,1968 ได้วิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยของโหระพา โดยนำมาแยกด้วยวิธี Gas chromatography และศึกษาคุณสมบัติของช่วงเวลาในการเก็บรักษา พบว่า น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยสารเคมี 32 ชนิด และมีองค์ประกอบ 6 ชนิด ที่ยังไม่ได้วิเคราะห์ สารที่วิเคราะห์ได้ที่สำคัญคือ camphor, β-pinene, p-methoxy behzaldehyde, bornyl acetate, methy eugenol และ p-methoxycin namaldehyde นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณสารเคมีที่พบในน้ำมันหอมระเหยของโหระพาจะแตกกต่างกันไปในพืชที่ปลูกในบริเวณอุณหภูมิต่างกัน

Tohra *et al.*,1970 ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยของโหระพาจากบัลกาเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Trichophyton niveum*, *Microsporum gypseum* และ *Candida albicans* ได้

Rao ad Rao .,1971 ได้ทดสอบผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชในสกุล Ocimum และพืชอื่นๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพบว่า น้ำมันหอมระเหยจาก *Ocimum*. var. *thyrsiflorum* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Trichophyton mentagrophytes* , *T. rubrum*, *Epidermophyton floccossum* และ *Candida albicans* ได้ และเฉพาะน้ำมันหอมระเหย *Ocimum*._var.*thyrsiflorum* เท่านั้นที่ยับยั้งการเจริญเมื่อทำให้เจือจาง 1 : 1000

Singh *et al.*, 1971 ได้ศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของระยะห่างระหว่างต้นและความถี่ในการตัดต้นของโหระพาพบว่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากน้ำหนักสด จะมีค่าอยู่ระหว่าง 0.20- 0.30 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ GLC พบว่าน้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยองค์ประกอบ 13 อย่าง โดยมี linalool 54.7 เปอร์เซ็นต์

Karawya *et al.*, 1974 ได้นำใบและดอกของโหระพา (*O.basilicum* และ *O. rubrum* L.) มาสกัดน้ำมันหอมระเหย พบว่า มี linalool และ methyl chavicol เป็นองค์ประกอบสำคัญ

Kurucz *et al.*, 1978 ได้นำโหระพา สเปียร์มินต์ (spearmint) ไธม์ (thyme) และพืชชนิดอื่น ๆ มาทดสอบประสิทธิภาพต่อจุลินทรีย์ 7 ชนิด พบว่า พืชเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ดังกล่าวนี้ได้และเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยและองค์ประกอบของพวกที่เป็นแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่สกัดจากพืชแต่ละชนิดมาทดสอบ พบว่าพืช family Labiatae มีประสิทธิภาพต่อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด

Pichitakul *et al.*, 1978 ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเพาะปลูกโหระพาเพื่อนำมาใช้ในการกลั่นน้ำมันหอมระเหย เพื่อจำหน่ายและตรวจคุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันโหระพาโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี พบว่าน้ำมันหอมระเหยของโหระพาประกอบด้วย methyl chavicol และ α - humulene 88.2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าสารประเภทแอลกอฮอล์ที่สกัดได้จากน้ำมันหอมระเหยของโหระพาสามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ coagulase ของ *Micrococcus pyogenes var. aureus* (The wealth of India, 1966)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. พืชที่นำมาใช้ในการทดลอง

   -ต้นโหระพาโดยใช้เนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นส่วนของลำต้นใบเลี้ยงและใบจากเมล็ดโหระพา (*Ocimum basilicum* Linn.)

2. สารเคมี

   2.1 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามสูตร MS ในภาคผนวก

   2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต

   - NAA (naphthaleneacetic acid)
   - BA (N_6-Benzyladenin)

   2.3 สารอินทรีย์

   - น้ำตาลซูโครส

   2.4 สารที่ใช้ทำวุ้นแข็งตัว

   - วุ้นผง (agar)

   2.5 สารเคมีที่ใช้ปรับ pH

   - โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล
   - กรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล

   2.6 สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทำความสะอาดเนื้อเยื่อก่อนย้ายลงขวดเพาะเลี้ยง

   - สารละลายไฮเตอร์
   - เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
   - น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

   2.7 สารฆ่าเชื้อในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ

   - เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดสาร

- อะซิโตไนไตร์ท (Acetonitrile)

2.9 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการวิเคราะห์ GC และ TLC

- สารละลายมาตราฐานยูจีนอล (Eugenol)
- สารละลายมาตราฐานลินาโลออล (Linalool)
- สารละลายมาตราฐานไพนีน (α-Pinene)
- สารละลายคลอโรฟอร์ม (Chloroform)
- สารละลายอะซิโตไนไตรท์ (Acetonitrile)

3. อุปกรณ์ที่ใช้

3.1 ประเภทเครื่องแก้ว

- บีกเกอร์, ปิเปตต์, ขวดวัดปริมาตร, กระบอกตวง, ขวดสีชา, แท่งแก้วคน, ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, จาน petri-dish, ขวดก้นกลม

3.2 เครื่องมือต่างๆ

1) เครื่องชั่ง (balance) ทั้ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
2) ช้อนตักสาร
3) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
4) เตาอบไมโครเวฟ (microwave)
5) ตู้เย็น (refrigerator)
6) เตาอบความร้อน (hot air oven)
7) หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
8) เครื่องปั่นเหวี่ยง
9) ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air-flow cabinet)
10) ตะเกียงบุนเซ็น
11) มีดผ่าตัดแบบต่างๆ
12) ปากคีบ
13) อุปกรณ์ถ่ายภาพ
14) เครื่องโฮโมจิไนเซอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15) เครื่องระเหยสารภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) บริษัท Laboratoriums-technik AG CH-9230 Flawili Schweiz, Switzerland

16) เครื่องวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟี (GC) Shimadzu รุ่น GC-17A System บริษัท BARA,windsor & Co.,LTD , USA.

17) คอลัมน์ DB-FFAP ยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร (narrow bore) ฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร บริษัท J&W Scientific Specializing in Separation Science, Canada

18) เข็มฉีดยาไมโครลิเตอร์ #701 ขนาด10 ไมโครลิตร บริษัท Hamilton company, USA

19) ดีเทคเตอร์ ชนิด เฟรม ไอออนไนเซชั่น ดีเทคเตอร์ (Flam Ionization Detector, FID)

20) ชุดอุปกรณ์โครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบาง(ThinLayerChromatography, TLC) ประกอบด้วยโถแก้ว capillary tube และแผ่น silica gel plate

21) เครื่องอัลตราไวโอเล็ตฟลูออเรสเซนต์ (Ultraviolet fluorescence analysis)

4. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งควบคุมการให้แสงที่ความเข้ม 700 ลักซ์ โดยหลอดฟลูออเรสเซนต์ Philips TLD36W/54+61 ช่วงสว่าง 16 ชั่วโมง ช่วงมืด 8 ชั่วโมง ต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีดำเนินการทดลอง

สามารถแบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เพิ่มปริมาณต้นโหระพาโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร MS

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาระดับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบ ในอาหาร MS ทั้ง 16 สูตรซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ทำการคัดเลือกและเพิ่มปริมาณแคลลัสในอาหาร MS ที่ถูกคัดเลือก

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ, ต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดทดลองและจากแคลลัสที่เกิดจากส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบของโหระพา โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบางและก๊าซโครมาโตกราฟี

ขั้นตอนที่ 4 เก็บรวบรวมผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ขั้นตอนที่ 5 สรุปผลการทดลองและนำเสนอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลองโดยละเอียด

ขั้นตอนที่ 1 เพิ่มปริมาณต้นโหระพาโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร MS

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. ขั้นตอนการเตรียมอาหาร
   1.1 นำอาหารผงสำเร็จรูป MS มาละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร แล้วแบ่งใส่ขวดสีชาขวดละ 100 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด
   1.2 นำสารละลายอาหาร MS ในขวดสีชามาเติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร
   1.3 ปรับปริมาตรสารละลายอาหาร MS ด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายอาหารมาปรับค่าความเป็นกรดและด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ให้ได้ประมาณ 5.6–5.8
   1.4 เติมวุ้นผง 8 กรัมต่อลิตร แล้วหลอมละลายวุ้นโดยใช้เตาไมโครเวฟ
   1.5 เทอาหารลงในภาชนะที่จะใช้เลี้ยง คือ ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดละประมาณ 10 มิลลิลิตร
   1.6 นำภาชนะอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำโดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ด
   2.1 นำเมล็ดโหระพา (*Ocimum basilicum* Linn.) มาใส่ลงใน microcentrifuge tube ประมาณ100-150 เมล็ด
   2.2 เติมสารละลายไฮเตอร์ลงไปใน microcentrifuge tube ประมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่า 10-15 นาที
   2.3 เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว ใช้ micropipette ดูดเอาสารละลายไฮเตอร์ออก และเติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วล้างเมล็ด 5-7 ครั้ง เขย่าครั้งละ 5-10 นาที
   2.4 เทเมล็ดโหระพาที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วลงบนจาน petri-dish ที่มีกระดาษทิชชูนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตั้งเมล็ดทิ้งไว้ให้แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ใช้ปากคีบที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วย้ายเมล็ดลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอาหารแข็ง MS ที่เตรียมไว้

2.6 นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความเข้มแสง 700 ลักซ์ และช่วงสว่าง 16 ชั่วโมง ช่วงมืด 8 ชั่วโมง ต่อวัน

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบในอาหาร MS ทั้ง 16 สูตร

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. ขั้นตอนการเตรียมอาหาร MS ทั้ง 16 สูตร

1.1 นำสารละลายอาหาร MS ในขวดสีชามาเติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

1.2 ปรับปริมาตรสารละลายอาหาร MS ด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1000 มิลลิลิตร และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ในอาหาร MS ทั้ง 16 สูตร ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 3.1 แสดงอัตราส่วนระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโต BA (mg/l) และ NAA (mg/l) ในอาหาร MS ทั้ง 16 สูตร

BA mg/l / NAA mg/l	0.1	0.5	1.0	1.5
0.1	1	2	3	4
0.5	5	6	7	8
1.0	9	10	11	12
1.5	13	14	15	16

1.3 จากนั้นนำสารละลายอาหารมาปรับค่าความเป็นกรดและด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ให้ได้ประมาณ 5.6–5.8

1.4 เติมวุ้นผง 8 กรัมต่อลิตร แล้วหลอมละลายวุ้นโดยใช้เตาไมโครเวฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 เทอาหารลงในภาชนะที่จะใช้เลี้ยง คือ ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดละประมาณ 10 มิลลิลิตร

1.6 นำภาชนะอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำโดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. ขั้นตอนการชักนำให้เกิดแคลลัส

2.1 นำต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS อายุประมาณ 14 วัน มาตัดแบ่งออกเป็นส่วนยอด ลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบ โดยส่วนยอดจะนำมาทำ subculture ลงในอาหาร MS ขวดใหม่เพื่อเพิ่มปริมาณ และขนาดต้นโหระพา

2.2 ส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงจะนำมาวางบนอาหาร MS ทั้ง 16 สูตร ขวดอาหารละ 2-3 ชิ้น โดยจะทำการทดลองระดับความเข้มข้นสูตรละ 5 ซ้ำ

2.3 ส่วนของใบจะนำมาวางบนอาหาร MS ทั้ง 16 สูตร ขวดอาหารละ 2 ชิ้น โดยจะทดลองระดับความเข้มข้นสูตรละ 5 ซ้ำ

2.4 สังเกตการเจริญเติบโตและลักษณะของแคลลัสจากส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบในอาหาร MS แต่ละสูตร และบันทึกผลการทดลอง

2.5 ทำการคัดเลือกสูตรอาหาร MS ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบ โดยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ Duncan's Multiple Rank Test (DMRT) และเพิ่มปริมาณแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบในอาหาร MS ที่คัดเลือกไว้

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ, ต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง, แคลลัสที่เกิดจากส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบโหระพา

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. ขั้นตอนการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ, ต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง, แคลัสที่เกิดจากส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบ

1.1 ขั้นตอนการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติและ ต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1.1 นำต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติและต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดทดลองที่มีอายุประมาณ 50 วัน มาชั่งน้ำหนักตัวอย่างละประมาณ 10 กรัม และนำมาใส่ในบีกเกอร์ 2 บีกเกอร์

1.1.2 เติมสารละลายอะซิโตไนไตร์ท 200 มิลลิลิตร และนำมาปั่นให้ละเอียดโดยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์

1.1.3 นำสารละลายส่วนใสมาใส่ในขวดก้นกลมแล้วนำไประเหยภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่องระเหยสารภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

1.1.4 นำขวดก้นกลมมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณสารหลังขั้นตอนการสกัด

1.1.5 เติมสารละลายอะซิโตไนไตร์ทลงในขวดก้นกลม 1-3 มิลลิลิตร เพื่อละลายสารที่ติดอยู่ที่ก้นขวด แล้วนำสารสกัดอย่างหยาบ (crude extract) มาเก็บในขวดขนาดเล็กที่มีจุกปิดและห่อฟอยล์เก็บไว้ไม่ให้โดนแสงแดด

1.2 ขั้นตอนการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากแคลลัส

1.2.1 นำแต่ละส่วนของแคลลัสที่ได้จากลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบที่มีอายุประมาณ 50 วัน มาชั่งน้ำหนักตัวอย่างละประมาณ 10 กรัม แล้วแบ่งใส่ในบีกเกอร์ 2 ใบ

1.2.2 เติมสารละลายอะซิโตไนไตร์ท 200 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์แต่ละใบและนำมาปั่นให้ละเอียดโดยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์

1.2.3 นำสารละลายส่วนใสมาใส่ในขวดก้นกลมแล้วนำไประเหยภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่องระเหยสารภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

1.2.4 นำขวดก้นกลมมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณสารหลังขั้นตอนการสกัด

1.2.5 เติมสารละลายอะซิโตไนไตร์ทลงในขวดก้นกลม 1-3 มิลลิลิตร เพื่อละลายสารที่ติดอยู่ที่ก้นขวด แล้วนำสารสกัดอย่างหยาบมาเก็บในขวดขนาดเล็กที่มีจุกปิดและห่อ ฟอยล์เก็บไว้ไม่ให้โดนแสงแดด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ขั้นตอนการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย

2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบาง

2.1.1 เตรียมสารตัวทำละลายในโถแก้ว ซึ่งประกอบด้วยสารละลายคลอโรฟอร์มและสารละลายอะซิโตไนไตร์ท ในอัตราส่วน 7 : 3 จากนั้นนำกระดาษกรองมาวางไว้ที่ผนังรอบๆด้านในและจุ่มลงในตัวทำละลายเพื่อให้ในโถแก้วมีการอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

2.1.2 ดูดสารสกัดอย่างหยาบจากแต่ละตัวอย่างด้วย capillary tube แล้วนำมาจุดลงบน silica gel plate ซึ่งเป็น stationary phase และจุดสารละลายมาตรฐานเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบกับสารที่แยกออกมาโดยแต่ละจุดห่างกัน 1.5 เซนติเมตร

2.1.3 จากนั้นนำ silica gel plate ที่มีจุดของสารตัวอย่างไปวางตั้งไว้ในโถแก้วที่มีตัวทำละลาย (ตัวทำละลายต้องไม่ท่วมจุดตัวอย่าง) mobile phase จะเคลื่อนที่ผ่าน silica gel จนเกือบถึงขอบของ silica gel plate จากนั้นให้เอา silica gel plate ออก ขีดเส้นที่ตำแหน่งสุดท้ายที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ เพื่อนำมาหาค่าอัตราส่วนระหว่างระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (ค่า Rf)

2.1.4 จากนั้นนำ silica gel plate มาวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยโดยนำผ่านแสง UV เพื่อดูการเรืองแสงของสารที่แยกได้ ถ้าสารที่แยกออกมาไม่สามารถเรืองแสงได้ ให้นำ silica gel plate มาพ่นด้วย conc. H_2SO_4 ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบของสารที่แยกออกมาทำให้เกิดความร้อนขึ้นทำให้เห็นจุดสีน้ำตาลบน silica gel plate

2.1.5 หาค่า R_f เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารแต่ละชนิด

2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยโดยเทคนิคก๊าซโครมาโตกราฟี

2.2.1 การเตรียมเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี

2.2.1.1 เปิดถังแก๊สที่ใช้บรรจุตัวพา (carrier gas) เพื่อที่จะพาไอของสารตัวอย่างผ่ารเข้าไปในคอลัมน์ได้แก่ N, He, Ar เป็นต้น และปรับอัตราการไหลของก๊าซ โดยให้อัตราการไหลของก๊าซไนโตรเจน 50 มิลลิลิตรต่อนาที, ไฮโดรเจน 50 มิลลิลิตรต่อนาที และอากาศ 250 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1.2 การปรับอุณหภูมิและสภาวะของเครื่อง กำหนดให้

อุณหภูมิอินเจคเตอร์	200	องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของคอลัมน์	200	องศาเซลเซียส
อุณหภูมิดีเทคเตอร์	220	องศาเซลเซียส
ความดันของคอลัมน์	96	กิโลปาสคาล
อัตราการไหลของคอลัมน์	1.2	มิลลิลิตรต่อนาที
Linear velocity	28	เซนติเมตรต่อวินาที
อัตราการไหลทั้งหมด	40	มิลลิลิตรต่อนาที

2.2.2 การวิเคราะห์สกัดอย่างหยาบโดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี

2.2.2.1 นำสกัดอย่างหยาบที่สกัดได้จากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ, ต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง, แคลลัสที่เกิดจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบ และสารละลายมาตรฐานยูจีนอล, ลินาโลออล และไพนีน ตัวอย่างครั้งละ 1 ไมโครลิตร ฉีดเข้าไปในช่อง injection port สารก็จะกลายเป็นไอแล้วถูกพาเข้าไปในคอลัมน์ DB-FFAP ยาว 30 เมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร (narrow bore) ด้วยแก๊สฮีเลียมซึ่งเป็น carrier gas อย่างช้าๆ สารผสมจะถูกแยกออกเป็นส่วนๆ ที่คอลัมน์แล้วออกไปสู่ดีเทคเตอร์แบบเฟลมไอออนไนเซชั่นทำให้ได้สัญญาณเกิดขึ้น โดยแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรมด้วยเครื่อง recorder ซึ่งต่อเข้ากับเครื่อง printer

2.2.2.2 เปรียบเทียบโครมาโทแกรมที่ได้จากสารละลายมาตรฐานแต่ละตัวกับสารตัวอย่างที่สกัดได้จากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ, ต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง, แคลลัสที่เกิดจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบ

2.2.2.3 วิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารจากโครมาโทแกรมและบันทึกผลการทดลอง

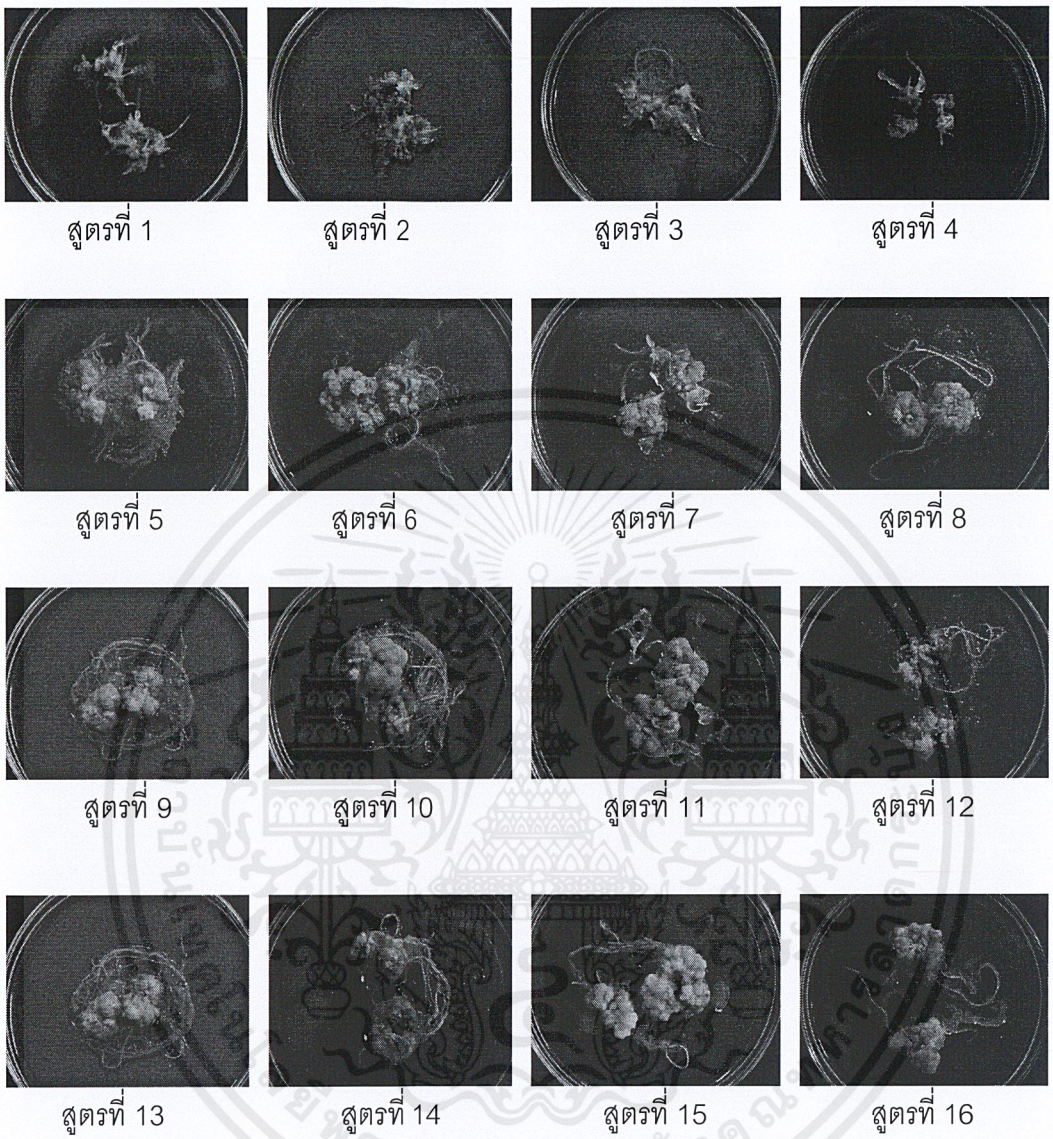
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 การคัดเลือกอาหารแข็งสูตร MS ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบของโหระพา

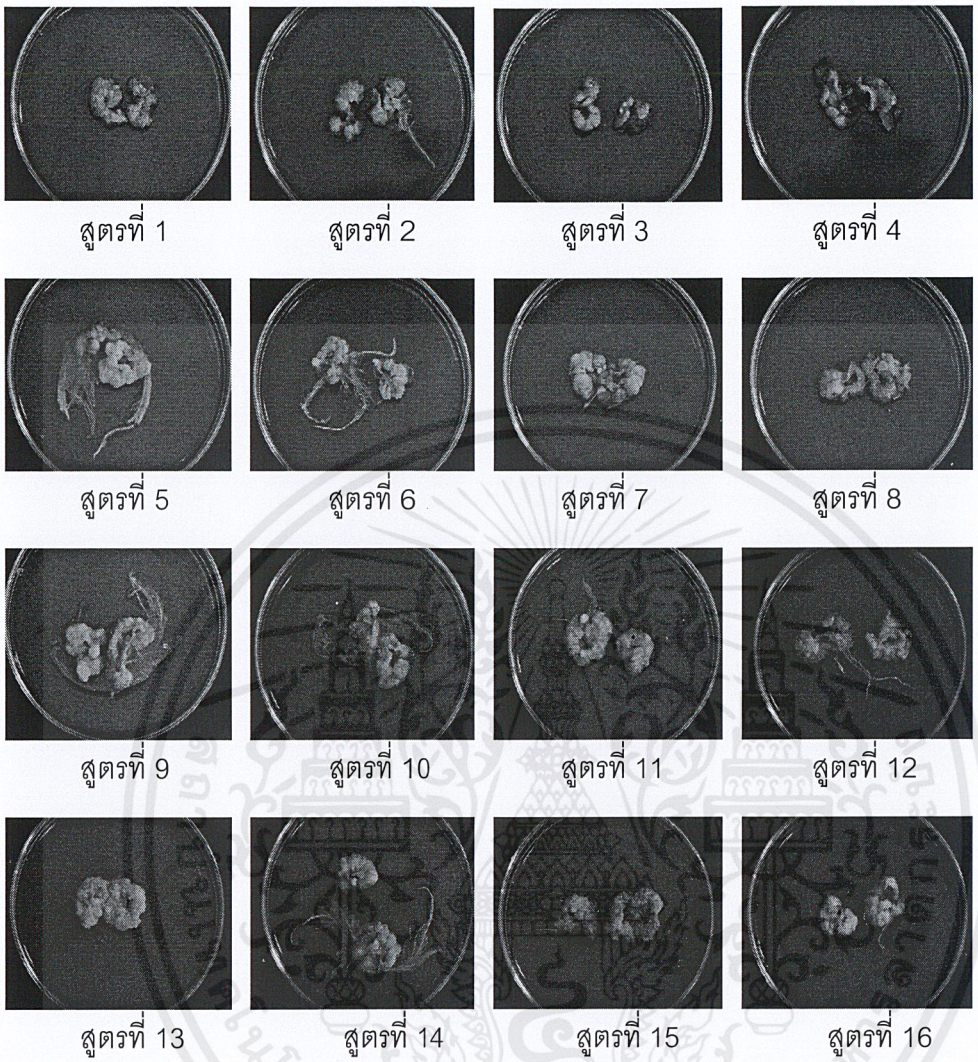
จากการนำลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบของต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงจากเมล็ดในขวดทดลองอายุ 14 วัน มาชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS ทั้ง 16 สูตร (ตารางที่ 3.1) โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 24 ± 1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 700 ลักซ์ และให้ช่วงสว่าง16 ชั่วโมง ช่วงมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 50 วัน ทำการบันทึกผลการทดลองโดยวัดปริมาณรากและชั่งน้ำหนักสดของแคลลัส (ตารางที่ 4.1 และตารางที่ 4.2) เมื่อนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลทางสถิติ พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS อย่างน้อย 2 สูตร แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4.5 และ 4.7) ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็ง MS ทั้ง 16 สูตรด้วยวิธีของดันแคน (Duncan's Multiple Rank Test; DMRT) พบว่า สามารถแบ่งระดับความแตกต่างของน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงออกเป็น 7 กลุ่ม (ตารางที่ 4.6) โดยอาหารแข็ง MS สูตรที่ 13 ให้น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงสูงสุด แต่ไม่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็ง MS สูตรที่ 6, 10, 11, 14 และ 15 ดังนั้น สูตรอาหารแข็ง MS ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงคือ อาหารแข็ง MS สูตรที่ 11 เนื่องจากอาหารแข็ง MS สูตรดังกล่าวทำให้แคลลัสเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและเกิดรากน้อย เมื่อเทียบกับอาหารแข็ง MS สูตรที่ให้น้ำหนักเฉลี่ยสูงในกลุ่มเดียวกัน (ตารางที่ 4.3) เมื่อทำการเปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสจากใบด้วยวิธี DMRT พบว่า สามารถแบ่งระดับความแตกต่างของน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสจากใบออกเป็น 5 กลุ่ม (ตารางที่ 4.8) โดยพบว่าอาหารแข็ง MS สูตรที่ 15 ให้น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสสูงสุด แต่ไม่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็ง MS สูตรที่ 7, 8, 9, 10, 12, 13 และ 14 ดังนั้น สูตรอาหารแข็ง MS ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากใบ คือ อาหารแข็ง MS สูตรที่ 15 เนื่องจากสูตรดังกล่าวทำให้แคลลัสเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและไม่เกิดราก (ตารางที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เจริญเป็นระยะเวลา 50 วันบนอาหารแข็งสูตร MS ทั้ง 16 สูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของใบที่เจริญเป็นระยะเวลา 50 วันบนอาหารแข็งสูตร MS ทั้ง 16 สูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.3 แสดงต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลองเป็นระยะเวลา 50 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงน้ำหนักของแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ทั้ง 16 สูตร

อาหารแข็งสูตร MS สูตรที่	น้ำหนักสด (กรัม)	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
1	0.4992	0.6753
2	0.4838	0.5096
3	0.4418	0.6571
4	0.2838	0.3934
5	0.932	0.891
6	0.8699	1.3277
7	0.5348	0.648
8	0.9379	0.4847
9	1.0147	1.0384
10	1.5237	1.5406
11	1.173	1.1264
12	0.7371	0.8343
13	1.0863	2.0747
14	1.133	1.4869
15	1.1033	1.1143
16	1.0425	0.9666

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงน้ำหนักแคลลัสจากใบที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ทั้ง 16 สูตร

อาหารแข็งสูตร MS สูตรที่	น้ำหนักสด (กรัม)	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
1	0.6481	0.5599
2	0.616	0.5926
3	0.4696	0.4873
4	0.5261	0.3069
5	1.0513	0.7081
6	0.6335	0.8702
7	0.9232	0.9455
8	1.1718	0.7762
9	1.0509	1.638
10	1.0035	1.2218
11	0.8323	1.4729
12	0.7566	1.0779
13	0.9777	0.7588
14	0.747	1.7629
15	1.8118	1.3412
16	0.7279	0.6564

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณรากของแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบของโหระพาที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ทั้ง 16 สูตร

อาหารแข็งสูตร MS สูตรที่	ปริมาณราก	
	แคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยง	แคลลัสจากใบ
1	++	-
2	+	+
3	+	+
4	+	-
5	++++	++++
6	++	++
7	++	+
8	++	+
9	++++	++++
10	++++	+++
11	++	+
12	++	++
13	+++	-
14	++	++++
15	++	-
16	++	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยมีหลักเกณฑ์ในการเปรียบเทียบปริมาณรากดังนี้

ตารางที่ 4.4 หลักเกณฑ์ในการเปรียบเทียบปริมาณราก

สัญลักษณ์	หมายถึง	ลักษณะที่ปรากฏ	
		แคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยง	แคลลัสจากใบ
-	ไม่เกิดราก		
+	เกิดรากน้อยที่สุด		
++	เกิดรากปานกลาง		
+++	เกิดรากมาก		
++++	เกิดรากมากที่สุด		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของน้ำหนักแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ทั้ง 16 สูตร

Source of Variation	Degree of freedom	Sum of Square	Mean of Square	F-value
Culture	15	4.073	0.272	5.298*
Error	16	0.820	0.051	
Total	31	4.893		

C.V. = 24.44%

* significant at 5% level

สมมุติฐาน

Ho : น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เจริญบนอาหารแข็ง MS ทั้ง 16 สูตรไม่แตกต่างกัน

Ha : น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เจริญบนอาหารแข็ง MS อย่างน้อย 2 สูตรแตกต่างกัน

สรุปผลการทดสอบ ณ ระดับนัยสำคัญ 0.05 เนื่องจาก $F_{cal} = 5.298 > F_{0.05, 15,16} = 2.35$ แสดงว่า ยอมรับ Ha คือ น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เจริญบนอาหาร MS อย่างน้อย 2 สูตรแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MSทั้ง 16 สูตร ด้วยวิธี DMRT

อาหารแข็งสูตร MS	4	2	3	1	7	8	12	5	16	9	6	15	11	14	10	13
น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	0.3386	0.4967	0.5494	0.5872	0.5914	0.7113	0.7857	0.9115	1.0045	1.0265	1.0988	1.1088	1.1497	1.3099	0.5321	1.5805

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของน้ำหนักแคลลัสจากใบที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ทั้ง 16 สูตร

Source of Variation	Degree of freedom	Sum of Square	Mean of Square	F-value
Culture	15	3.097	0.206	2.541*
Error	16	1.30	0.081	
Total	31	4.397		

C.V. = 31.27%

* significant at 5% level

สมมุติฐาน

Ho : น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสจากใบที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ทั้ง 16 สูตรไม่แตกต่างกัน

Ha : น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสจากใบที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS อย่างน้อย 2 สูตรแตกต่างกัน

สรุปผลการทดสอบ ณ ระดับนัยสำคัญ 0.05 เนื่องจาก $F_{cal} = 2.541 > F_{0.05,\ 15,16} = 2.35$ แสดงว่า ยอมรับ Ha คือ น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสจากใบที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS อย่างน้อย 2 สูตรแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสจากใบที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MS ทั้ง 16 สูตรด้วยวิธี DMRT

อาหารแข็งสูตร MS	4	3	1	2	16	6	11	5	12	7	8	10	15	14	9	13
น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	0.4165	0.4784	0.604	0.6043	0.6921	0.7518	0.8682	0.8797	0.9172	0.9343	0.974	1.1126	1.1526	1.2549	1.3444	1.5765

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.1 วิจารณ์การคัดเลือกอาหารแข็งสูตร MS ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบของโหระพา

การวัดการเจริญเติบโตของแคลลัสในการทดลองนี้ ใช้น้ำหนักสดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาคัดเลือกอาหารแข็งสูตร MS ที่เหมาะสม แต่ไม่มีการชั่งน้ำหนักของลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบของโหระพาก่อนนำไปชักนำให้เกิดแคลลัส เพื่อให้ผลการวิเคราะห์การเจริญเติบโตที่ได้มีความถูกต้อง และน่าเชื่อถือจึงควรชั่งน้ำหนักของลำต้นใต้ใบเลี้ยงหรือใบก่อนนำไปชักนำให้เกิดแคลลัสและชั่งน้ำหนักสุดท้ายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน แล้วจึงนำผลที่ได้ไปหาค่าดรรชนีการเจริญเติบโต (Growth Index) ดังนี้

$$\text{ค่าดรรชนีการเจริญเติบโต (Growth Index)} = \frac{\text{น้ำหนักสดสุดท้าย - น้ำหนักสดเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}$$

จากนั้นนำค่าดรรชนีการเจริญเติบโตที่คำนวณได้จากแต่ละสูตรไปเปรียบเทียบกันทางสถิติเพื่อดูว่าอาหารแข็ง MS สูตรใดเป็นสูตรที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบของโหระพาที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง และเนื่องจากงานวิจัยนี้แต่ละการทดลองทำเพียง 2 ซ้ำเท่านั้น จึงอาจไม่มีความน่าเชื่อถือทางสถิติ ดังนั้น จึงควรชั่งน้ำหนักสดของแต่ละการทดลองอย่างน้อย 10 ซ้ำ แล้วนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติและที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลองและจากแคลลัสที่เกิดจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบของโหระพา

4.2.1 การวิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบบาง

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารที่สกัดได้จากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติที่มีน้ำหนักสด 10.3011 กรัม ในตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ท 200 มิลลิลิตร, ต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดทดลองที่มีน้ำหนักสด 10.1609 กรัม ในตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ท 200 มิลลิลิตร และสารสกัดจากแคลลัสที่เกิดจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS สูตรที่ 11 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.0 mg/l) ที่มีลักษณะของแคลลัสก่อนสกัดเป็นสีเขียวเข้มเกาะกลุ่มกันแน่น โดยใช้น้ำหนักสด 17.0226 กรัม ในตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ท 150 มิลลิลิตร และแคลลัสจากส่วนใบของโหระพาที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS สูตรที่ 15 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.5 mg/l) ที่มีลักษณะของแคลลัสก่อนสกัดเป็นสีเขียวอ่อนมีการเกาะกลุ่มกันแน่น โดยใช้น้ำหนักสด 15.0000 กรัม ในตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ท 150 มิลลิลิตร ส่วนความเข้มข้นของสารสกัดอย่างหยาบแต่ละชนิดจะแสดงดังตารางที่ 4.9

ตารางที่4.9 แสดงค่าความเข้มข้นของสารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัสและต้นโหระพา

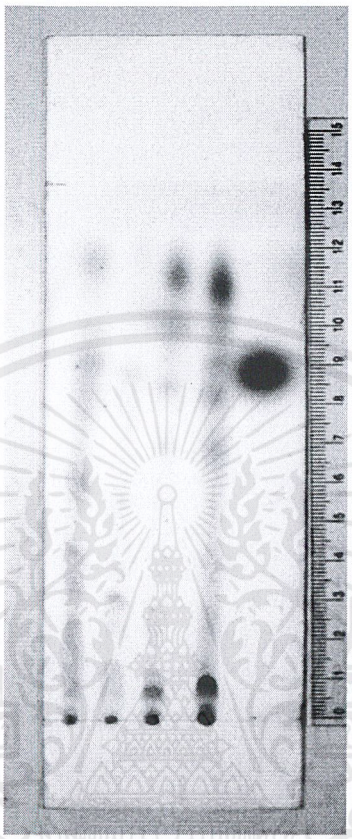
แหล่งที่สกัดสาร	น้ำหนักสดของตัวอย่างที่ใช้สกัด (g)	น้ำหนักของสารที่สกัดได้ (g)	ปริมาตรของตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ท (ml)	ความเข้มข้นของสารสกัดอย่างหยาบ (g/l)
แคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยง	17.0226	0.9029	2	451.45
แคลลัสจากส่วนของใบ	15.0000	1.0700	2	535.00
ต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง	10.1609	1.1933.	3	397.77
ต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ	10.3011	0.1800	3	60.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติที่มีความเข้มข้น 451.45 g/l, ต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดทดลองที่มีความเข้มข้น 535.00 g/l, แคลลัสที่เกิดจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS สูตรที่ 11 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.0 mg/l) ที่มีความเข้มข้น 397.77 g/l และแคลลัสจากใบของโหระพาที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS สูตรที่ 15 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.5 mg/l) ที่มีความเข้มข้น 60.00 g/l พบว่ามีความเข้มข้นของสารไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงไม่สามารถนำสารสกัดอย่างหยาบแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบองค์ประกอบและปริมาณของสารได้ และเมื่อนำสารสกัดอย่างหยาบจากแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบบางจะได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาเทียบกับสารมาตราฐานยูจีนอล



ก ข ค ง จ

รูปที่ 4.4 แสดงผลการตรวจสอบยูจีนอลจากต้นโหระพาและจากแคลลัสโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบบาง

กำหนดให้ ก คือ สารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัสจากลำต้นใต้ใบในสูตรอาหาร MS ที่ 11 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.0 mg/l) ความเข้มข้น 451.45 g/l

ข คือ สารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัสจากใบในสูตรอาหาร MS ที่ 15 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.5 mg/l) ความเข้มข้น 535.00 g/l

ค คือ สารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง ความเข้มข้น 397.77 g/l

ง คือ สารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ ความเข้มข้น 60.00 g/l

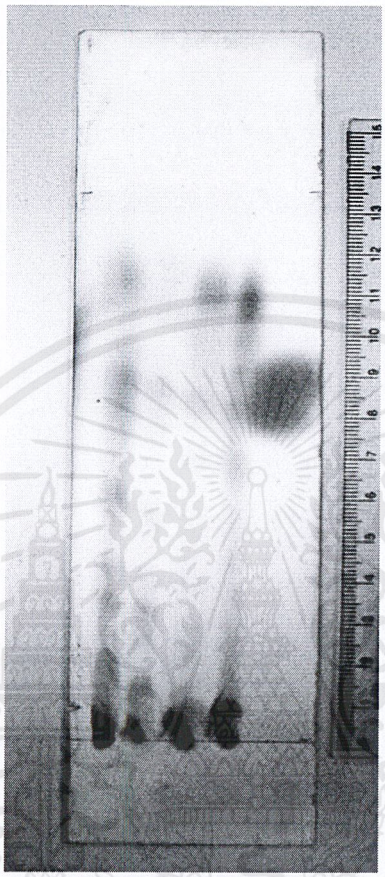
จ คือ สารละลายมาตราฐานยูจีนอลความเข้มข้น 10 g/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.4 พบว่าค่า Rf ของสารละลายมาตราฐานยูจีนอลมีค่าเท่ากับ 0.659 และมีแถบสีเป็นสีม่วง และเมื่อนำค่า Rf และแถบสีของละลายมาตราฐานยูจีนอลมาเปรียบเทียบกับสารตัวอย่าง ก, ข, ค และง พบว่าในสารตัวอย่างแต่ละชนิดจะพบแถบสีปรากฏขึ้นหลายสีและหลายตำแหน่ง และมีค่า Rf ที่ใกล้เคียงกับค่า Rf ของสารละลายมาตราฐานยูจีนอล ยกเว้นในสารสกัดจากตัวอย่าง ข ที่ไม่พบแถบสีและค่า Rf ใกล้เคียงกับสารละลายมาตรฐานยูจีนอล แต่เนื่องจากในการทดลองนี้ใช้ค่าความเข้มข้นของสารที่สกัดไม่เท่ากันและใช้จำนวนครั้งในการจุดสารไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงไม่สามารถเปรียบเทียบองค์ประกอบและปริมาณของสารตัวอย่างทั้ง 4 ชนิดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาเทียบกับสารมาตรฐานลินาโลออล



ก ข ค ง จ

รูปที่ 4.5 แสดงผลการตรวจสอบลินาโลออลจากต้นโหระพาและจากแคลลัสโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบบาง

กำหนดให้ ก คือ สารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ 11 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.0 mg/l) ความเข้มข้น 451.5 g/l

ข คือ สารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัสจากใบในสูตรอาหาร MS ที่ 15 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.5 mg/l) ความเข้มข้น 535.00 g/l

ค คือ สารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง ความเข้มข้น 397.77 g/l

ง คือ สารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ ความเข้มข้น 60.00 g/l

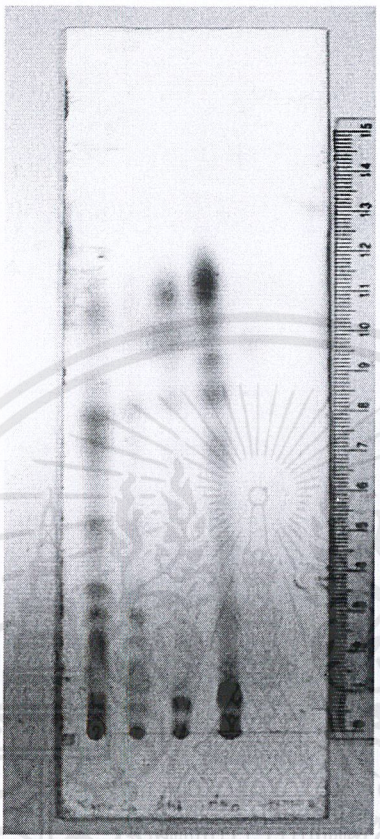
จ คือ สารละลายมาตราฐานลินาโลออลความเข้มข้น 54.00 g/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.5 พบว่าค่า Rf ของสารละลายมาตราฐานลินาโลออลมีค่าเท่ากับ 0.761 และมีแถบสีเป็นสีชมพู และเมื่อนำค่า Rf และแถบสีของละลายมาตราฐานลินาโลออลมาเปรียบเทียบกับสารตัวอย่าง ก, ข, ค และง พบว่าในสารตัวอย่างแต่ละชนิดจะพบแถบสีปรากฏขึ้นหลายสีและหลายตำแหน่ง และมีค่า Rf ที่ใกล้เคียงกับค่า Rf ของสารละลายมาตราฐานลินาโลออล แต่เนื่องจากในการทดลองนี้ใช้ค่าความเข้มข้นของสารที่สกัดไม่เท่ากันและใช้จำนวนครั้งในการจุดสารไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงไม่สามารถเปรียบเทียบองค์ประกอบและปริมาณของสารตัวอย่างทั้ง 4 ชนิดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1.3การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาเทียบกับสารมาตรฐานแอลฟาไพนีน



ก ข ค ง ช

รูปที่ 4.6 แสดงผลการตรวจสอบแอลฟาไพนีนจากต้นโหระพาและจากแคลลัสโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นแบบเคลือบบาง

กำหนดให้ ก คือ สารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงใต้ใบในสูตรอาหาร MS ที่ 11 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.0 mg/l) ความเข้มข้น 451.45 g/l

ข คือ สารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัสจากใบในสูตรอาหาร MS ที่ 15 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.5 mg/l) ความเข้มข้น 535.00 g/l

ค คือ สารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง ความเข้มข้น 397.77 g/l

ง คือ สารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ ความเข้มข้น 60.00 g/l

ช คือ สารละลายมาตราฐานแอลฟาไพนีน ความเข้มข้น 40.00 g/l

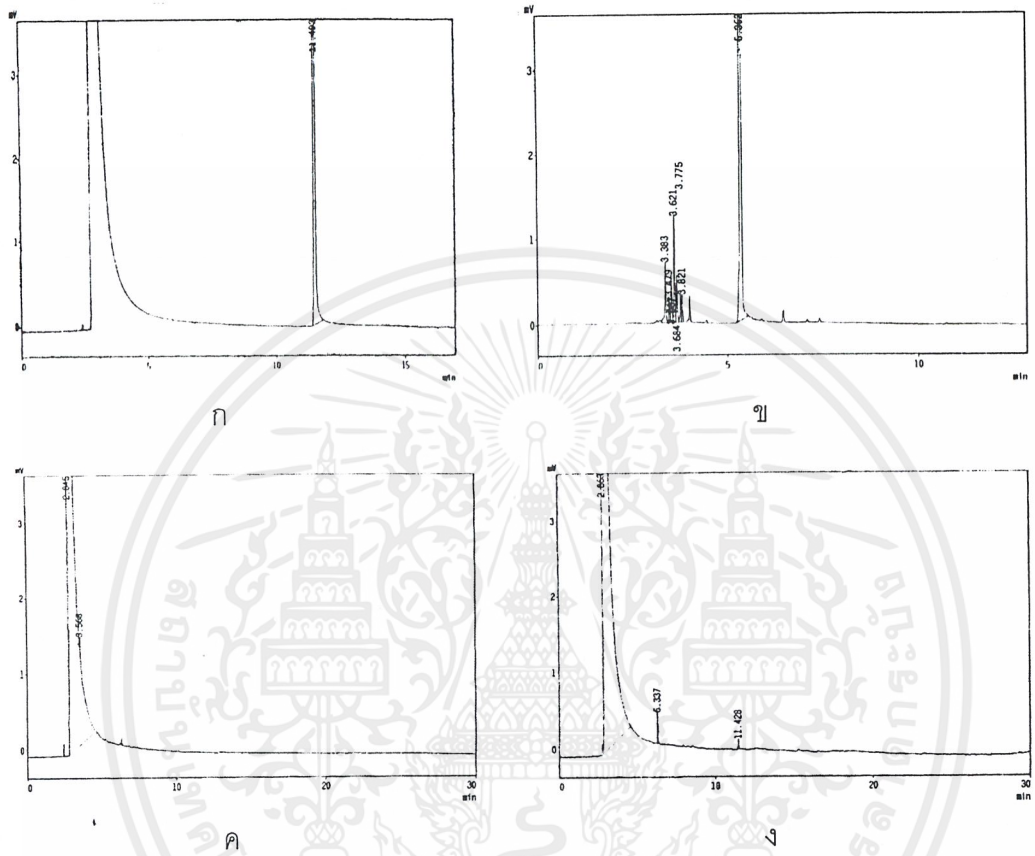
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.6 พบว่าค่า Rf ของสารละลายมาตราฐานแอลฟาไพนีนมีค่าเท่ากับ 0.738 และมีแถบสีเป็นสีดำ และเมื่อนำค่า Rf และแถบสีของละลายมาตราฐานแอลฟาไพนีนมาเปรียบเทียบกับสารตัวอย่าง ก, ข, ค และง พบว่าในสารตัวอย่างแต่ละชนิดจะพบแถบสีปรากฏขึ้นหลายสีและหลายตำแหน่ง และมีค่า Rf ที่ใกล้เคียงกับค่า Rf ของสารละลายมาตราฐานแอลฟาไพนีน ยกเว้นในสารสกัดจากตัวอย่าง ข ที่ไม่พบแถบสีและค่า Rf ใกล้เคียงกับสารละลายมาตรฐานแอลฟาไพนีน แต่เนื่องจากในการทดลองนี้ใช้ค่าความเข้มข้นของสารที่สกัดไม่เท่ากันและใช้จำนวนครั้งในการจุดสารไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงไม่สามารถเปรียบเทียบองค์ประกอบและปริมาณของสารตัวอย่างทั้ง 4 ชนิดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การวิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโตกราฟี

4.2.2.1 การวิเคราะห์สารสกัดโดยเทคนิคก๊าซโครมาโตกราฟีของสารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติความเข้มข้น 60.00 g/l เทียบกับสารละลายมาตราฐาน



ก ข

ค ง

รูปที่ 4.7 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติความเข้มข้น 60.00 g/l

กำหนดให้ ภาพ ก คือภาพโครมาโทแกรมของสารละลายมาตราฐานยูจีนอลที่ความเข้มข้น 10.00 g/l โดยมีสารละลายอะซิโตไนไตร์ทเป็นตัวทำละลาย

ภาพ ข คือภาพโครมาโทแกรมของสารละลายมาตราฐานลินาโลออลที่ความเข้มข้น 54.00 g/l แต่ไม่มีสารละลายอะซิโตไนไตร์ทเป็นตัวทำละลาย

ภาพ ค คือภาพโครมาโทแกรมของสารละลายมาตราฐานแอลฟาไพนีนที่ความเข้มข้น 40.00 g/l โดยมีสารละลายอะซิโตไนไตร์ทเป็นตัวทำละลาย

ภาพ ง คือภาพโครมาโทแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติความเข้มข้น 60.00 g/l โดยมีสารละลายอะซิโตไนไตร์ทเป็นตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

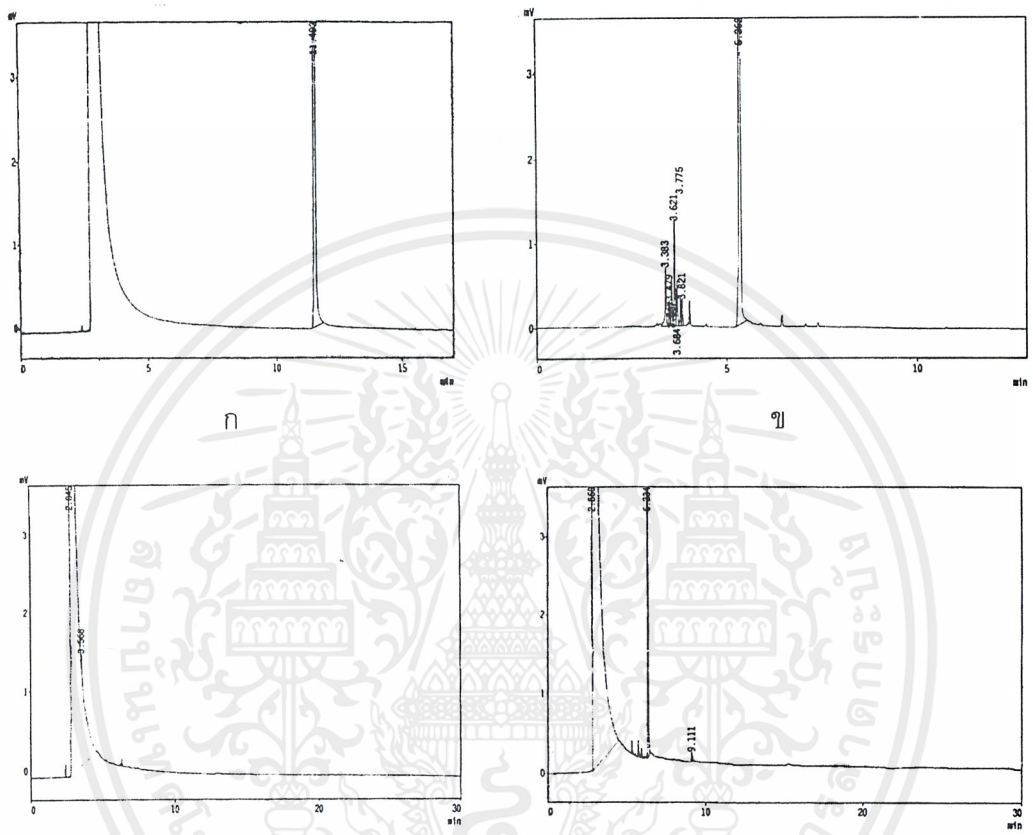
จากภาพที่ 4.7 (ก) พบว่ามีกราฟเกิดขึ้น 2 ตำแหน่ง คือที่ตำแหน่ง ret time ที่ 2.853 และ 11.493 ตามลำดับ โดยค่า ret time แรกจะเป็นค่า ret time ของตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ท ส่วนค่า ret time ที่ 2 จะเป็นค่า ret time ของสารละลายมาตราฐานยูจีนอล ส่วนภาพที่ 4.7 (ข) พบว่ามีกราฟเกิดขึ้นหลายตำแหน่ง แต่ที่ตำแหน่ง ret time ที่ 5.362 จะมีค่าความเข้มข้นสูงสุด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าที่ตำแหน่ง ret time ที่ 5.362 เป็นตำแหน่ง ret time ของสารละลายมาตราฐานลินาโลออล ส่วนภาพที่ 4.7 (ค) พบว่ามีกราฟเกิดขึ้น 2 ตำแหน่ง คือที่ตำแหน่ง ret time ที่ 2.845 และ 3.568 ตามลำดับ โดยค่า ret time แรกจะเป็นค่า ret time ของตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ท ส่วนค่า ret time ที่ 2 จะเป็นค่า ret time ของสารละลายมาตราฐานแอลฟาไพนีน เมื่อนำภาพโครมาโทแกรมของสารละลายมาตราฐานทั้ง 3 ภาพมาเปรียบเทียบกับภาพโครมาโทแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ พบว่าภาพที่ 4.7 (ง) มีกราฟเกิดขึ้น 3 ตำแหน่ง คือที่ตำแหน่ง ret time ที่ 2.863, 6.337 และ 11.428 ตามลำดับ โดยค่า ret time แรกจะเป็นค่า ret time ของตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ท ส่วนค่า ret time ที่ 2 จะเป็นค่า ret time ของสาร unknownเนื่องจากมีค่า ret time ไม่ตรงกับค่า ret time ของสารละลายมาตราฐานทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง ส่วนค่า ret time ที่ 3 เป็นค่า ret time ของสารละลายมาตราฐานยูจีนอล เนื่องจากมีค่า ret time ที่ใกล้เคียงกับค่า ret time ของสารละลายมาตราฐานยูจีนอล

ตารางที่ 4.10 ตารางแสดงร้อยละขององค์ประกอบในสารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติที่ความเข้มข้น 60.00 g/l

Peak NO.	Ret time	Area	Height	ร้อยละ
1	2.863	9092132	1064198	99.9851
2	6.337	831	407	0.0091
3	11.428	528	134	0.0058

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2.2 การวิเคราะห์สารสกัดโดยเทคนิคก๊าซโครมาโตกราฟีของสารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดทดลองความเข้มข้น 397.77 g/ml เทียบกับสารละลายมาตราฐาน



ก ข

ค ง

รูปที่ 4.8 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดทดลองความเข้มข้น 397.77 g/l

กำหนดให้ ภาพ ก คือภาพโครมาโทแกรมของสารละลายมาตราฐานยูจีนอลที่ความเข้มข้น 10.00 g/l โดยมีสารละลายอะซิโตไนไตร์ทเป็นตัวทำละลาย

ภาพ ข คือภาพโครมาโทแกรมของสารละลายมาตราฐานลินาโลออลที่ความเข้มข้น 54.00 g/l แต่ไม่มีสารละลายอะซิโตไนไตร์ทเป็นตัวทำละลาย

ภาพ ค คือภาพโครมาโทแกรมของสารละลายมาตราฐานแอลฟาไพนีนที่ความเข้มข้น 40.00 g/l โดยมีสารละลายอะซิโตไนไตร์ทเป็นตัวทำละลาย

ภาพ ง คือภาพโครมาโทแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดทดลองความเข้มข้น 397.77 g/l โดยมีสารละลายอะซิโตไนไตร์ทเป็นตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

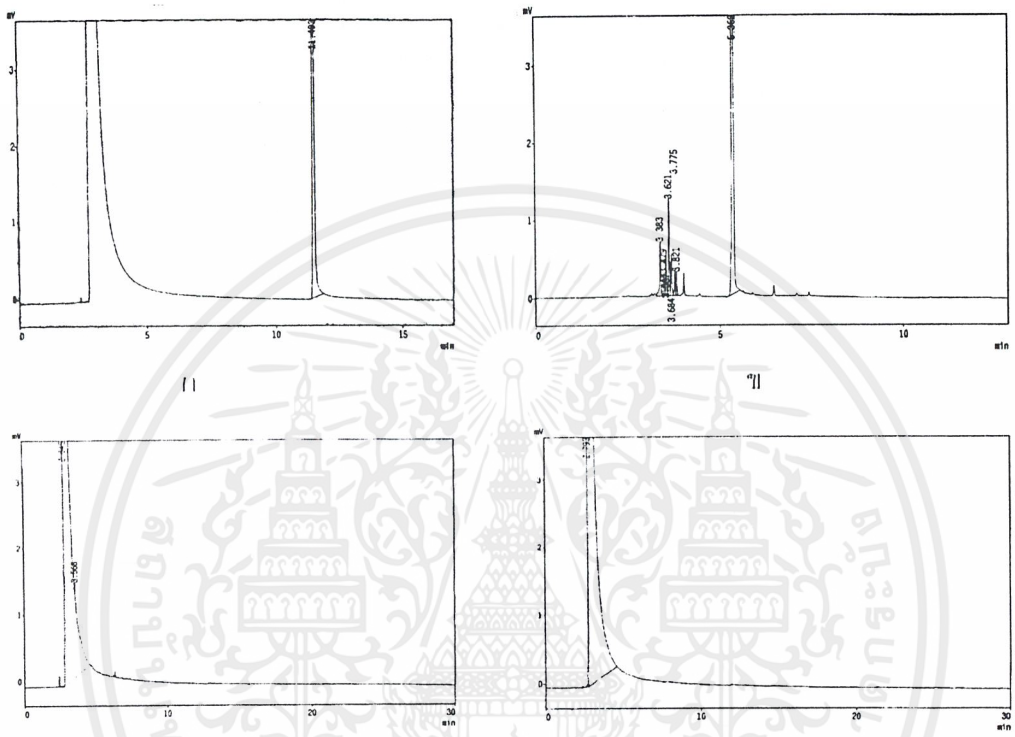
จากภาพที่ 4.8 (ก) พบว่ามีกราฟเกิดขึ้น 2 ตำแหน่ง คือที่ตำแหน่ง ret time ที่ 2.853 และ 11.493 ตามลำดับ โดยค่า ret time แรกจะเป็นค่า ret time ของตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ท ส่วนค่า ret time ที่ 2 จะเป็นค่า ret time ของสารละลายมาตราฐานยูจีนอล ส่วนภาพที่ 4.8 (ข) พบว่ามีกราฟเกิดขึ้นหลายตำแหน่ง แต่ที่ตำแหน่ง ret time ที่ 5.362 จะมีค่าความเข้มข้นสูงสุด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าที่ตำแหน่ง ret time ที่ 5.362 เป็นตำแหน่ง ret time ของสารละลายมาตราฐานลินาโลออล ส่วนภาพที่ 4.8 (ค) พบว่ามีกราฟเกิดขึ้น 2 ตำแหน่ง คือที่ตำแหน่ง ret time ที่ 2.845 และ 3.568 ตามลำดับ โดยค่า ret time แรกจะเป็นค่า ret time ของตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ท ส่วนค่า ret time ที่ 2 จะเป็นค่า ret time ของสารละลายมาตราฐานแอลฟาไพนีน เมื่อนำภาพโครมาโทแกรมของสารละลายมาตราฐานทั้ง 3 ภาพมาเปรียบเทียบกับภาพโครมาโทแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง พบว่าภาพที่ 4.8 (ง) มีกราฟเกิดขึ้น 3 ตำแหน่ง คือที่ตำแหน่ง ret time ที่ 2.860, 6.334 และ 9.111 ตามลำดับ โดยค่า ret time แรกจะเป็นค่า ret time ของตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ท ส่วนค่า ret time ที่ 2 และ 3 จะเป็นค่า ret time ของสาร unknownเนื่องจากมีค่า ret time ไม่ตรงกับค่า ret time ของสารละลายมาตราฐานทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 4.11 ตารางแสดงร้อยละขององค์ประกอบในสารสกัดอย่างหยาบจากต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง ความเข้มข้น 397.77 g/l

Peak NO.	Ret time	Area	Height	ร้อยละ
1	2.860	8091728	1065186	99.7646
2	6.334	18565	8324	0.2289
3	9.111	530	119	0.0065

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2.3 การวิเคราะห์สารสกัดโดยเทคนิคก๊าซโครมาโตกราฟีของสารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงใต้ใบในสูตรอาหาร MS ที่ 11 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.0 mg/l) ความเข้มข้น 451.45 g/l เทียบกับสารละลายมาตราฐาน



ก ข

ค ง

รูปที่ 4.9 **แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่** 11 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.0 mg/l) **ความเข้มข้น** 451.45 g/l

กำหนดให้ ภาพ ก คือภาพโครมาโทแกรมของสารละลายมาตราฐานยูจีนอลที่ความเข้มข้น 10.00 g/l โดยมีสารละลายอะซิโตไนไตร์ทเป็นตัวทำละลาย

ภาพ ข คือภาพโครมาโทแกรมของสารละลายมาตราฐานลินาโลออลที่ความเข้มข้น 54.00 g/l แต่ไม่มีสารละลายอะซิโตไนไตร์ทเป็นตัวทำละลาย

ภาพ ค คือภาพโครมาโทแกรมของสารละลายมาตราฐานแอลฟาไพนีนที่ความเข้มข้น 40.00 g/l โดยมีสารละลายอะซิโตไนไตร์ทเป็นตัวทำละลาย

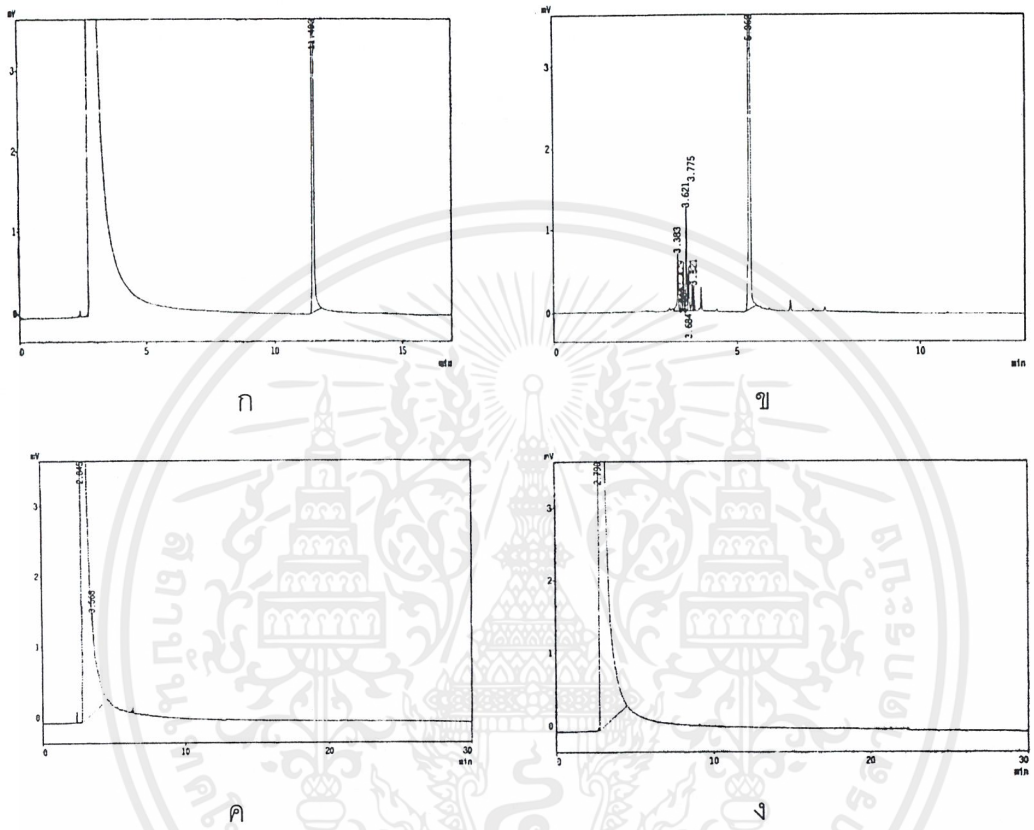
ภาพ ง คือภาพโครมาโทแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ 11 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.0 mg/l) ความเข้มข้น 451.45 g/l โดยมีสารละลายอะซิโตไนไตร์ทเป็นตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.9 (ก) พบว่ามีกราฟเกิดขึ้น 2 ตำแหน่ง คือที่ตำแหน่ง ret time ที่ 2.853 และ 11.493 ตามลำดับ โดยค่า ret time แรกจะเป็นค่า ret time ของตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ท ส่วนค่า ret time ที่ 2 จะเป็นค่า ret time ของสารละลายมาตราฐานยูจีนอล ส่วนภาพที่ 4.9 (ข) พบว่ามีกราฟเกิดขึ้นหลายตำแหน่ง แต่ที่ตำแหน่ง ret time ที่ 5.362 จะมีค่าความเข้มข้นสูงสุด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าที่ตำแหน่ง ret time ที่ 5.362 เป็นตำแหน่ง ret time ของสารละลายมาตราฐานลินาโลออล ส่วนภาพที่ 4.9 (ค) พบว่ามีกราฟเกิดขึ้น 2 ตำแหน่ง คือที่ตำแหน่ง ret time ที่ 2.845 และ 3.568 ตามลำดับ โดยค่า ret time แรกจะเป็นค่า ret time ของตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ท ส่วนค่า ret time ที่ 2 จะเป็นค่า ret time ของสารละลายมาตราฐานแอลฟาไพนีน เมื่อนำภาพโครมาโทแกรมของสารละลายมาตราฐานทั้ง 3 ภาพมาเปรียบเทียบกับภาพโครมาโทแกรมของสารสกัดอย่างหยาบความเข้มข้น 451.45 g/l จากแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ 11 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.0 mg/l) พบว่าภาพที่ 4.9 (ง) จะพบเฉพาะกราฟของตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ท แต่ไม่พบกราฟของสารประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นน้ำมันหอมระเหย เนื่องจากแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงของโหระพาในสูตรอาหาร MS ที่ 11 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.0 mg/l) เป็นกลุ่มเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวและยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรือวัยวะชนิดต่างๆจึงไม่มีการสร้างสารที่มีคุณสมบัติเป็นน้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นสารทุติยภูมิได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ 11 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.0 mg/l) ไม่สามารถสร้างและสะสมสารที่มีคุณสมบัติเป็นน้ำมันหอมระเหยได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2.4 การวิเคราะห์สารสกัดโดยเทคนิคก๊าซโครมาโตกราฟีของสารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัสจากใบในสูตรอาหาร MS ที่ 15 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.5 mg/l) ความเข้มข้น 535.00 g/l เทียบกับสารละลายมาตราฐาน



รูปที่ 4.10 **แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัสจากใบในสูตรอาหาร MS ที่** 15 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.5 mg/l) **ความเข้มข้น** 535.00 g/l

กำหนดให้ ภาพ ก คือภาพโครมาโทแกรมของสารละลายมาตราฐานยูจีนอลที่ความเข้มข้น 10.00 g/l โดยมีสารละลายอะซิโตไนไตร์ทเป็นตัวทำละลาย

ภาพ ข คือภาพโครมาโทแกรมของสารละลายมาตราฐานลินาโลออลที่ความเข้มข้น 54.00 g/l แต่ไม่มีสารละลายอะซิโตไนไตร์ทเป็นตัวทำละลาย

ภาพ ค คือภาพโครมาโทแกรมของสารละลายมาตราฐานแอลฟาไพนีนที่ความเข้มข้น 40.00 g/l โดยมีสารละลายอะซิโตไนไตร์ทเป็นตัวทำละลาย

ภาพ ง คือภาพโครมาโทแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัสจากใบในสูตรอาหาร MS ที่ 15 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.5 mg/l) ความเข้มข้น 535.00 g/l โดยมีสารละลายอะซิโตไนไตร์ทเป็นตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.10 (ก) พบว่ามีกราฟเกิดขึ้น 2 ตำแหน่ง คือที่ตำแหน่ง ret time ที่ 2.853 และ 11.493 ตามลำดับ โดยค่า ret time แรกจะเป็นค่า ret time ของตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ท ส่วนค่า ret time ที่ 2 จะเป็นค่า ret time ของสารละลายมาตราฐานยูจีนอล ส่วนภาพที่ 4.10 (ข) พบว่ามีกราฟเกิดขึ้นหลายตำแหน่ง แต่ที่ตำแหน่ง ret time ที่ 5.362 จะมีค่าความเข้มข้นสูงสุด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าที่ตำแหน่ง ret time ที่ 5.362 เป็นตำแหน่ง ret time ของสารละลายมาตราฐานลินาโลออล ส่วนภาพที่ 4.10 (ค) พบว่ามีกราฟเกิดขึ้น 2 ตำแหน่ง คือที่ตำแหน่ง ret time ที่ 2.845 และ 3.568 ตามลำดับ โดยค่า ret time แรกจะเป็นค่า ret time ของตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ท ส่วนค่า ret time ที่ 2 จะเป็นค่า ret time ของสารละลายมาตราฐานแอลฟาไพนีน เมื่อนำภาพโครมาโทแกรมของสารละลายมาตราฐานทั้ง 3 ภาพมาเปรียบเทียบกับภาพโครมาโทแกรมของสารสกัดอย่างหยาบความเข้มข้น 535.00 g/l จากแคลลัสจากใบในสูตรอาหาร MS ที่ 15 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.5 mg/l) พบว่าภาพที่ 4.10 (ง) จะพบเฉพาะกราฟของตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ท แต่ไม่พบกราฟของสารประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นน้ำมันหอมระเหย เนื่องจากแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงของโหระพาในสูตรอาหาร MS ที่ 15 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.5 mg/l) เป็นกลุ่มเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวและยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรือวัยวะชนิดต่างๆจึงไม่มีการสร้างสารที่มีคุณสมบัติเป็นน้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นสารทุติยภูมิได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ 15 (BA 1.0 mg/l : NAA 1.5 mg/l) ไม่สามารถสร้างและสะสมสารที่มีคุณสมบัติเป็นน้ำมันหอมระเหยได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การคัดเลือกสูตรอาหารแข็ง MS ที่เหมาะสมในการชักนำลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบของโหระพาที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลองอายุ 14 วัน โดยการชั่งน้ำหนักสดของแคลลัสที่มีอายุ 50 วัน และวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าอาหารแข็ง MS สูตร 11 เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยง เนื่องจากอาหารแข็ง MS สูตร 11 ทำให้แคลลัสเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและเกิดรากน้อย เมื่อเทียบกับอาหารแข็งสูตร MS ที่ให้น้ำหนักเฉลี่ยสูงในกลุ่มเดียวกันโดยวิธีของดันแคน (Duncan's Multiple Rank Test; DMRT) และเมื่อทำการเปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสจากใบด้วยวิธี DMRT พบว่าอาหารแข็ง MS สูตร15 ให้น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสสูงสุด และทำให้แคลลัสเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและไม่เกิดรากเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ ต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง แคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS สูตร 11 และแคลลัสจากใบบนอาหารแข็ง MS สูตร 15 โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบางเทียบกับสารมาตรฐานยูจีนอลเข้มข้น 10.00 g/l สารมาตรฐานลินาโลออลเข้มข้น 54.00 g/l และสารมาตรฐานแอลฟาไพนีนเข้มข้น 40.00 g/l พบว่าเกิดแถบสีตรงกับแถบสีของสารมาตรฐานดังกล่าว และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยโดยใช้เทคนิคก๊าซโครมาโตกราฟี พบว่า น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติมีองค์ประกอบที่วิเคราะห์ได้คือยูจีนอล เนื่องจาก retention time ของสารสกัดดังกล่างที่ 11.428 มีค่าตรงกับ retention time ของสารมาตรฐานยูจีนอล (11.493) ส่วนการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง พบว่ามีองค์ประกอบทั้งหมด 3 ชนิด (รูปที่ 4.8 ง และตารางที่ 4.10) โดยมี retention time ไม่ตรงกับ retention time ของสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง นอกจากนั้นยังพบว่าองค์ประกอบที่มีค่า retention time เท่ากับ 6.334 มีปริมาณสูงสุด ซึ่งคาดว่าสารชนิดนี้น่าจะเป็นองค์ประกอบหลักที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหยจากต้นโหระพา และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบบนอาหารแข็ง MS สูตร 11 (รูปที่ 4.9) และ สูตร 15 (รูปที่ 4.10) ตามลำดับ พบว่า ไม่พบองค์ประกอบของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำมันหอมระเหย แสดงว่าแคลลัสไม่สามารถผลิตน้ำมันหอมระเหยได้ เนื่องจากแคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวและยังไม่มีการเปลี่ยนแปลพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่างๆ จึงไม่มีการสร้างสารที่มีคุณสมบัติเป็นน้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นสารทุติยภูมิได้

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษากับพืชโหระพาเบื้องต้นเท่านั้น จึงควรศึกษาการผลิตน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรชนิดอื่นเพิ่มเติมอีก
2. ควรมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันหอมระเหยจากแคลลัสของโหระพาหรือพืชสมุนไพรชนิดอื่นๆ เพื่อประโยชน์สำหรับศึกษาปริมาณและองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยในแคลลัสเปรียบเทียบกับส่วนต่างๆ ของพืชต่อไป
3. ควรมีการศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ เช่น องค์ประกอบของอาหารสูตร MS ที่อาจมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตน้ำมันหอมระเหยของพืช หรือปัจจัยที่จะทำให้ได้น้ำมันหอมระเหยปริมาณมาก
4. เนื่องจากปริมาณและองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากโหระพาแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ฤดูของการเก็บตัวอย่าง แหล่งที่ปลูก สารอาหารที่พืชได้รับ รวมทั้งระยะเวลาหลังการเก็บเกี่ยว ดังนั้นในการทดลองแต่ละครั้งควรใช้สายพันธุ์เดียวกันและเก็บตัวอย่างมาจากแหล่งที่ปลูก ที่ระยะเวลาเดียวกัน และควรวิเคราะห์ทันทีหลังการเก็บเกี่ยว เนื่องจากถ้าเก็บไว้นานโอกาสที่น้ำมันหอมระเหยจะสูญเสียไปย่อมมีมาก
5. ควรมีการศึกษาการผลิตน้ำมันหอมระเหยจากพืชที่ปลูกโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและที่ปลูกตามธรรมชาติว่าแบบใดลดค่าใช้จ่ายและสะดวกกว่ากัน เพื่อประโยชน์ต่อการผลิตน้ำมันหอมระเหยในระดับอุตสาหกรรมต่อไป
6. จากการทดลองพบว่าแคลลัสของโหระพาสามารถผลิตสารสีต่างๆมากมาย ดังนั้นควรมีการศึกษาวิธีสกัดเอาสารสีเหล่านั้นออกมา เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

พีระศักดิ์ วรสุนทรโรสถและคณะ ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ลำดับที่ 19 : พืชที่ให้น้ำมันหอม สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) หน้า 14 - 47 สำนักพิมพ์สหมิตรพริ้นติ้ง พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ. 2544.

บัญญัติ สุขศรีงาม เครื่องเทศที่เป็นสมุนไพร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน 2524.

แม้น อมรสิทธิ์และอมร เพชรสม หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ หน้า 811 - 860 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รวมพร มณีโรจน์ "ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยของตะไคร้ โหระพาและวนิลาในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย " ปัญหาทางชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ บางแสน 2524.

วิสูตร วัฒนชัยยงค์ " การวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลในน้ำมันหอมระเหยจากพืช " ภาคนิพนธ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ บางแสน 2525.

วีรพงษ์ โพธิ์เมือง น้ำมันโหระพา วิทยาสาร ม.ข. 2: 11-14, 2517

David R. Gang, Jihong Wang, Natalia Dudareva, Kyoung Hee, James E. Simon, Efraim Lewinsohn, and Eran Pichersky "AnInvestigation of the Storage and Biosynthesis of Phenylpropenes in Sweet Basil " Plant Physiology 125 (2001) : 539-555.

Karawya, M.S. and others Oil of *Ocimum basilicum* L., and Ocimum rubrum L. grow in Egypt. Food Science and Technology Abstracts, 1974, 6 : 9T526.

Kurucz, Istvan and others Phytoncides (antimicrobial agents) in Medicinal Plants Chemical Abstracts; 1978, 92 : 191892Z.

Pogany, D. and others Composition of oil of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) obtained from plants grown at different temperature. Food Science and Technology Abstracts, 1968, 5T : 158.

Rao, B.G.V.N. and P.S., Rao. The efficacy of essential oils against pathogenic fungi. Food Science and Technology Abstracts, 1971, 4 : 1T77.

Robert K.M. Hay and Peter G. Waterman. Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production, pp. 47 -57, Longman Scientific & Technical, 1993.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Singh, H.S. and others Cultivation of basil (*Ocimum basilicum* L.) at Jorhat, Assam and the chemical composition of its oil. Food Science and Technology Abstracts, 1971, 1T83.

Tohra, P. and others Physiochemical characterristics and antifungal activity of basil oil and its fraction. Chemical Abstracts, 1970, 79 : 35034X

The Weath of India A Dictionary of Indian Raw Materials & Industrial Products Raw Materials Vol II. Sp-W Publication & Information Directorate, New Delhi, 1966, 330 pp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้