สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตน้ำมันหอมระเหยจากเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกะเพรา

นางสาวขนิษฐา โฆษิตนิธิกุล
นางสาวนฤมล สุทธพินทุ
นางสาวยุวศรี ไพชยนต์วิจิตร

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 43969
วัน, เดือน, ปี 18 ต.ค. 2545

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

โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Miss Kanittha Kositnitikul

Miss Narumol Sutthapintu

Miss Yuwasri Paichayonvijit

A Special Project Submitted in Partial Fulfiillment of the

Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตน้ำมันหอมระเหยจากเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกะเพรา

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

โดย นางสาวขนิษฐา โฆษิตนิธิกุล รหัสประจำตัว 41053011

นางสาวนฤมล สุทธพินทุ รหัสประจำตัว 41053031

นางสาวยุวศรี ไพชยนต์วิจิตร รหัสประจำตัว 41053061

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อ. พนา โลหะทรัพย์ทวี

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง) หัวหน้าภาควิชา

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

.....

(ผศ. นวรัตน์ ปานแย้ม) ประธานกรรมการ

.....

(อ.พนา โลหะทรัพย์ทวี) กรรมการ

.....

(ดร. กนกพร สมพรไพลิน) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตน้ำมันหอมระเหยจากเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกะเพรา
นักศึกษา นางสาวขนิษฐา โฆษิตนิธิกุล
นางสาวนฤมล สุทธพินทุ
นางสาวยุวศรี ไพชยนต์วิจิตร
อาจารย์ที่ปรึกษา อ.พนา โลหะทรัพย์ทวี
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา 2544

บทคัดย่อ

การผลิตน้ำมันหอมระเหยจากกะเพราโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ทำโดยเพาะเมล็ดกะเพราลงในอาหาร MS เมื่อกล้ากะเพรามีอายุ 14 วัน ทำการตัดส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงมาวางบนอาหาร MS ทั้ง 16 สูตร ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ในปริมาณแตกต่างกัน สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสเกิดการพัฒนาไปเป็นต้น คือ MS สูตร 10 (BA 1.0 มก./ล.,NAA 0.5 มก./ล) แต่ MS สูตร 16 (BA 1.5 มก./ล.,NAA 1.5 มก./ล) เป็นสูตรที่แคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นราก จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณแคลลัสในสูตรอาหารที่เลือกนำต้นกะเพราและแคลลัสที่มีอายุ 50 วัน มาสกัดโดยใช้ตัวทำละลายคือ อะซิโตไนไตรล์ วิเคราะห์สารสกัดอย่างหยาบที่ได้โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบางและกาซโครมาโตกราฟี อย่างไรก็ตามไม่พบน้ำมันหอมระเหยในแคลลัสทั้ง 2 สูตร แต่พบน้ำมันหอมระเหยในต้นที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Volatile Oil Production in Tissue Culture of *Ocimum sanctum Linn.*
Name	Miss Kanittha Kositnitikul
	Miss Narumol Sutthapintu
	Miss Yuwasri Paichayontvijit
Special Project Advisor	Teacher Pana Lohasubtawee
Department	Applied Biology
Acadamic Year	2001

Abstract

Sixteen different MS media were tested for callus initiation from hypocotyls of 14-day-old seedlings of *Ocimum sanctum.* MS medium No. 10 which contained 1 mg/l BA and 0.5 mg/l NAA was selected for shoot regeneration. MS medium No. 16 which contained 1.5 mg/l BA and 1.5 mg/l NAA was selected for root regeneration. However, callus were mass propagated in these two selected media. Fifty-day-old callus and in vitro plantlets of *Ocimum sanctum* extracted and analysed by gas chromatography for volatile oils. The results showed that volatile oils were not found in crude extracts of callus but crude extracts from in vitro plantlets,volatile oils were found.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ พนา โลหะทรัพย์ทวี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา ให้ความรู้และข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์ต่อการทำโครงงานพิเศษ อีกทั้งยังได้ช่วยกรุณาหาอุปกรณ์ที่จำเป็น ได้แก่ เครื่องโฮโมจิไนเซอร์ ชุดโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบาง เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้สละเวลาเพื่อช่วยตรวจแก้ไขโครงงานพิเศษ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ผู้เป็นประธานกรรมการโครงงานพิเศษ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.กนกพร สมพรไพลิน ผู้เป็นกรรมการโครงงานพิเศษ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่ได้อนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตลอดจนสารเคมี และอุปกรณ์ต่าง ๆ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพยอม เกียรติกำจร และคุณประเสริฐวิทย์ แพงคำ นักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการชีววิทยาที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกอุปกรณ์และสารเคมี ช่วยสั่งซื้อสารเคมีบางอย่าง เช่น สารมาตรฐาน (standard) ยูจีนอล ไพนีน ลินาลูออล เป็นต้น และยังให้ความสะดวกในการทำโครงงานพิเศษตลอดมา

นอกจากนี้ขอบคุณเพื่อนๆ และพี่ปริญญาโททุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำโครงงานพิเศษจนโครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย		ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญตาราง		จ
สารบัญรูป		ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ		ช
บทที่ 1	บทนำ	1
บทที่ 2	ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3	การดำเนินการวิจัย/งานวิจัย	20
บทที่ 4	ผลการวิจัยและวิจารณ์	30
บทที่ 5	สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	51
ภาคผนวก		
เอกสารอ้างอิง		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสพืชชนิดต่าง ๆ	8
ตารางที่ 2	แสดงอัตราส่วนระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ในอาหาร MS ทั้ง 16 สูตร	25
ตารางที่ 3	ลักษณะและน้ำหนักของแคลลัส 50 วัน จากส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงในสูตรอาหาร 16 สูตร	32
ตารางที่ 4	ความเข้มข้นของสารสกัดอย่างหยาบ (crude extract) จากกะเพราที่ใช้ในการวิเคราะห์โครมาโตกราฟี	34
ตารางที่ 5	ค่า R_f จากการคำนวณแถบโครมาโตกราฟีรูปที่ 11	36
ตารางที่ 6	ค่า R_f จากการคำนวณแถบโครมาโตกราฟีรูปที่ 12 ก.	38
ตารางที่ 7	ค่า R_f จากการคำนวณแถบโครมาโตกราฟีรูปที่ 12 ข.	39
ตารางที่ 8	ค่า R_f จากการคำนวณแถบโครมาโตกราฟีรูปที่ 13	41
ตารางที่ 9	ค่า R_f จากการคำนวณแถบโครมาโตกราฟีรูปที่ 14 ก.	43
ตารางที่ 10	ค่า R_f จากการคำนวณแถบโครมาโตกราฟีรูปที่ 14 ข.	43
ตารางที่ 11	ร้อยละขององค์ประกอบในสารสกัดอย่างหยาบจากต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง	46
ตารางที่ 12	ร้อยละขององค์ประกอบในสารสกัดอย่างหยาบจากต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงในธรรมชาติ	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	ต้นกะเพราขาว (*Ocimum sanctum Linn.*)	1
รูปที่ 2	แผนภาพเครื่องกาซโครมาโตกราฟี	13
รูปที่ 3	ช่องฉีดสาร	14
รูปที่ 4	สูตรโครงสร้างเมทิลยูจีนอล	17
รูปที่ 5	วิถีการสังเคราะห์เมธิลยูจีนอล	18
รูปที่ 6	การปรับอุณหภูมิและการตั้งค่าเครื่องกาซโครมาโตกราฟี	28
รูปที่ 7	การพัฒนาเป็นกล้าที่อายุต่าง ๆ ของเมล็ดกะเพราในอาหาร MS	30
รูปที่ 8	อิทธิพลของความเข้มแสงต่อการเจริญของกล้ากะเพรา	31
รูปที่ 9	แคลลัสที่กำลังพัฒนาไปเป็นต้น ถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์	33
รูปที่ 10	อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสกะเพราไปเป็นต้น และ/หรือ ราก	33
รูปที่ 11	แถบสารบน TLC หลังจากพ่นกรดซัลฟิวริก เทียบกับสารละลายมาตรฐานยูจีนอล	35
รูปที่ 12	แถบสารบน TLC หลังจากพ่นกรดซัลฟิวริก เทียบกับสารละลายมาตรฐานลินาลูออล	37
รูปที่ 13	แถบสารบน TLC หลังจากพ่นกรดซัลฟิวริก เทียบกับสารละลายมาตรฐานไพนีน	40
รูปที่ 14	แถบสารบน TLC หลังจากพ่นกรดซัลฟิวริก เปรียบเทียบแคลลัสต้นจากการเพาะเลี้ยง และต้นที่ปลูกตามธรรมชาติ	42
รูปที่ 15	เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากกะเพราที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลองกับสารมาตรฐาน	45
รูปที่ 16	โครมาโตแกรมของสารสกัดอย่างหยาบในแคลลัสกะเพรา	46
รูปที่ 17	เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากกะเพราที่เพาะเลี้ยงในธรรมชาติกับสารมาตรฐาน	47
รูปที่ 18	เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากกะเพรา	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

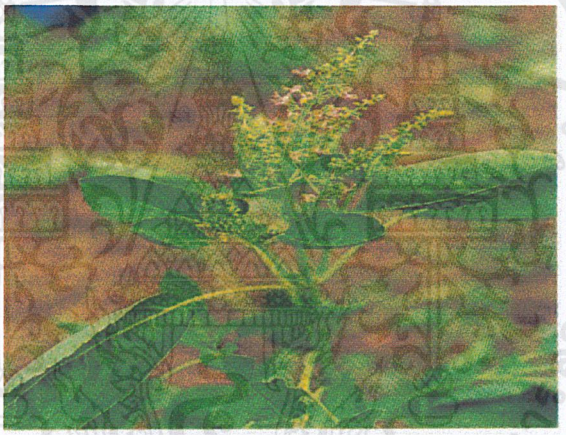
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

มก./ล.	มิลลิกรัมต่อลิตร
ส.	สัปดาห์
2,4 – D	2,4 -Dichlorophenoxyacetic acid
BA	6 – Benzyladinine
GC	Gas chromatography
IAA	indole-3-acetic acid
MS	สูตรอาหารของ Murashige and Skoog
NAA	α– Naphaleneacetic acid
TLC	Thin- layer chromatography
ret. time	retention time

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

กะเพรา (holy basil) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ocimum sanctum Linn.* เป็นพืชในวงศ์ LABIATAE มีชื่อท้องถิ่นว่า กอมก้อ กอมก้อดง ห่อตูปลู เป็นต้น ลักษณะเป็นไม้พุ่มเตี้ย ทุกส่วนของต้นมีกลิ่นหอม ขนาดสูง 60 เซนติเมตร โคนต้นเป็นไม้เนื้อแข็ง ตามลำต้นและใบมีขนปกคลุม ออกดอกเป็นช่อ นิยมปลูกในแถบเมืองร้อน มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย ทั้งในทางบริโภคและในทางการแพทย์



รูปที่ 1 ต้นกะเพราขาว (*Ocimum sanctum Linn.*)
ที่มา : http://www.proedtown.com

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับกะเพรามากขึ้น เนื่องจากสารที่สกัดได้จากกะเพรามีน้ำมันหอมระเหยจำพวก eugenol linalool chavicol ocimol เป็นต้น น้ำมันหอมระเหยเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น สามารถไล่แมลงได้ น้ำมันจากใบใช้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ การสกัดจากใบกะเพราโดยตรงให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหย 0.01% ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยมาก จึงได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสมาใช้ในการทดลอง เพื่อให้สามารถผลิตน้ำมันหอมระเหยได้ในปริมาณมากขึ้น และเพื่อที่จะควบคุมสภาวะให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต นอกจากนี้สารที่ได้จากการสกัดมีความบริสุทธิ์ ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์และสารพิษ ทำให้สามารถนำมาใช้ในทางการแพทย์ได้เป็นอย่างดี อีกทั้งยังสามารถเพิ่มปริมาณต้นได้เป็นจำนวนมากในเวลาอันสั้น ซึ่งเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ศึกษานี้ เป็นการเพาะเลี้ยงเมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กะเพราโดยใช้สูตรอาหารวิทยาศาสตร์ของ Murashige และ Skoog จากนั้นนำส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบ มาเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ ที่มีสัดส่วนแตกต่างกันเพื่อกระตุ้นให้เกิดแคลลัส เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดเป็นแคลลัส เมื่อเลือกสูตรอาหารแล้วจะทำการเพิ่มจำนวนแคลลัสในสูตรอาหารที่เลือกเพื่อใช้ในขั้นตอนการสกัด จากนั้นสารสกัดที่ได้จะนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบ โดยใช้วิธีกาซโครมาโตกราฟี

วัตถุประสงค์

1. เปรียบเทียบปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบกะเพรากับที่สกัดจากแคลลัส
2. ศึกษาองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ปลูกต้นกะเพราโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควบคู่ไปกับการนำมาชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส โดยนำส่วนของใบและลำต้นใต้ใบเลี้ยงมาเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในสัดส่วนที่แตกต่างกันจากนั้นเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดเป็นแคลลัส ทำการเพิ่มจำนวนแคลลัสในสูตรอาหารที่เลือกเพื่อใช้ในขั้นตอนการสกัด จากนั้นสารสกัดที่ได้จะนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบ โดยใช้วิธีกาซโครมาโตรกราฟี

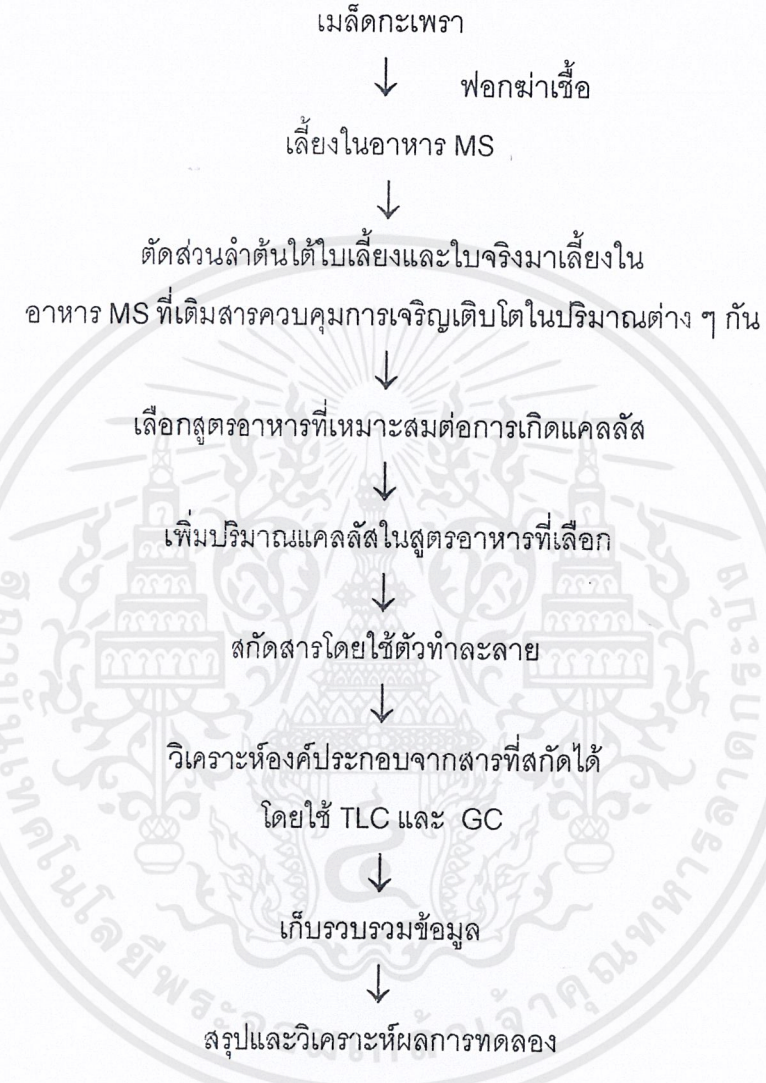
วิธีดำเนินการโดยสังเขป

โครงงานพิเศษในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาจากกะเพราขาว โดยสามารถแสดงแผนภาพของวิธีดำเนินการวิจัยโดยสังเขปได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนภาพที่ 1

แสดงวิธีการดำเนินการวิจัยโดยสังเขป



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพิ่มปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากกะเพราโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. ทราบองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง

สภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืชโดยทั่วไป มีส่วนสัมพันธ์กันทั้งภายในและภายนอกของพืช ปัจจัยภายในจะเกี่ยวข้องกับยีนหรือดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นตัวกำหนดลักษณะทางพันธุกรรม ส่วนปัจจัยภายนอก ได้แก่ อุณหภูมิ แสงสว่าง คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และแร่ธาตุต่าง ๆ

ธาตุอาหารที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืชมีมากมาย รวมไปถึงสารควบคุมการเจริญเติบโตซึ่งพืชสามารถสร้างได้เองตามธรรมชาติ แต่ถ้าต้องการชักนำให้เกิดเป็นส่วนที่ต้องการก็สามารถเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเหล่านั้นแก่พืชได้

ธาตุอาหาร

ธาตุอาหารที่พืชต้องการประกอบด้วย

1. ธาตุอาหารอนินทรีย์

   ธาตุอาหารอนินทรีย์ที่ต้องการมาก (Macro – element) ได้แก่ C H O N P K Ca Mg S

   ธาตุอาหารอนินทรีย์ที่ต้องการน้อย (Micro – element) ได้แก่ Fe Mn Cu Zn B Cl Mo

2. ธาตุอาหารอินทรีย์

   2.1 วิตามิน ที่ใช้กันมาก ได้แก่ Thiamine Nicotinic acid Pyridoxine Inositol Biotin Panthothenic acid Folic acid Choline Chloride Riboflavin Ascorbic acid

   2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช พืชจะมีการสร้างมากในส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ (apical meristem) สารควบคุมการเจริญเติบโตที่พืชส่วนใหญ่ต้องการ ได้แก่

   2.2.1 สารในกลุ่มออกซิน เช่น

   - indole-3-acetic acid (IAA)
   - indole butyric acid (IBA)
   - Napthaleneacetic acid (NAA)
   - 2,4,5-trichlophenoxyacetic acid (2,4,5-T)

คุณสมบัติโดยทั่วไปของสารในกลุ่มออกซิน มีผลต่อสรีระวิทยาพืชดังนี้

1. กระตุ้นการยืดตัวของเซลล์
2. กระตุ้นการยืดตัวของราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. กระตุ้นให้เกิดแคลลัสในเนื้อเยื่อ
4. กระตุ้นให้เกิด apical dominance ในพืช
5. ช่วยในการเปลี่ยนเพศดอก จากเพศผู้เป็นเพศเมียในพืชตระกูลแตง
6. ยับยั้งการเจริญของตาข้างเมื่อมีความเข้มข้นสูง
7. ช่วยให้เกิด parthenocarpic ในผลไม้
8. ช่วยในการสังเคราะห์เอทิลีนซึ่งเป็นกาซในผลไม้สุก

2.2.2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน เช่น

- N_6-Benzyladenine (BA)
- Kinetin
- Zeatin
- N_6-isopentenyl adenine

มีคุณสมบัติดังนี้

1. กระตุ้นการแบ่งเซลล์
2. ชะลอการแก่ในใบและผล
3. ช่วยในการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารของพืช
4. กระตุ้นการเจริญเติบโตของตาข้าง
5. ช่วยในการเปลี่ยนสภาพของเซลล์

2.2.3 สารควบคุมการเจริญอื่น ๆ เช่น

- Giberellic acid (GA)
- Abscissic acid (ABA)
- Daminozide

2.3 สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ สารประกอบน้ำตาลต่าง ๆ เช่น กลูโคส ซูโครส ฟรัคโตส แซคคาโรส แมนนิทอล

2.4 กรดอะมิโน ได้แก่ กลูตามิน แอสพาราจีน อะดีนิน ไกลซีน เคซีน

2.5 สารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ เช่น น้ำมะพร้าว สารสกัดจากยีสต์ น้ำต้มมันฝรั่ง กล้วยบด มอลต์สกัด เป็นต้น

ธาตุอาหารที่พืชทั่ว ๆ ไปต้องการเพื่อการเจริญเติบโตนั้น ได้มีการคิดหาปริมาณที่เหมาะสมและพัฒนาไปเป็นอาหารสังเคราะห์เพื่อความสะดวกในห้องปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือ อาหารสูตร MS (1962)

มีส่วนประกอบดังนี้

	มก./ล.
NH_4NO_3	165
KNO_3	190
$CaCl_2.2\ H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	37
KH_2PO_4	17
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4.4H_2O$	2.23
$ZnSO_4.7H_2O$	0.86
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.0025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Na_2-EDTA	37.73
$FeSO_4.7H_2O$	2.78
Glycine	0.2
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Inositol	10
Nicotinic acid	0.050
Sucrose	30,000
ปรับพีเอช	5.6 – 5.8

การเตรียมชิ้นส่วนพืชที่ใช้เพาะเลี้ยง

ชิ้นส่วนที่ใช้ควรมีสภาพที่เหมาะต่อการชักนำการเกิดแคลลัส กล่าวคือ เป็นชิ้นส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญจากเนื้อเยื่อที่มีอายุน้อย ในทางปฏิบัตินิยมใช้เนื้อเยื่อจากเมล็ดที่เพาะให้งอกใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาพปลอดเชื้อให้เกิดส่วนของราก ยอด และใบอ่อน เมล็ดเป็นแหล่งที่ดีที่สุดในการให้ชิ้นส่วนพืชเพื่อเลี้ยงเป็นแคลลัส เพราะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยตรง

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส

1. **ขนาดและรูปร่าง** พืชทั่วไปมักจำเป็นต้องใช้ชิ้นส่วนที่มีขนาดค่อนข้างเล็กแต่ไม่ถึงกับเล็กจนเกินไป นั่นคือ มี critical minimum size ซึ่งถ้าชิ้นส่วนมีขนาดเล็กกว่านี้แล้วจะไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

2. **สารควบคุมการเจริญเติบโต** โดยเฉพาะออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองนี้มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ โดยทั่วไปแล้วถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง (ออกซิน > ไซโตไคนิน) แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนนี้ต่ำ (ออกซิน < ไซโตไคนิน) จะพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้น และถ้าหากสมดุลจะพัฒนาไปเป็นแคลลัสต่อไป ความเข้มข้นที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่าง ๆ นั้นพบว่า ออกซินจะอยู่ในช่วง 0.01 – 10.0 มก./ล. และไซโตไคนินจะอยู่ในช่วง 0.1 – 10.0 มก./ล. ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณและสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อพืชที่นำมาใช้

3. **ธาตุอาหาร** นอกจากพืชจะต้องการธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบหลักทั่ว ๆ ไปของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว อาหารเสริมพวกกรดอะมิโน เช่น กลูตามิน แอสปาติน อาร์จินิน พิวรีน และไพริมิดีน สารพวกเคซินไฮโดรไลเซท สารสกัดจากมอลต์ ยีสต์ และน้ำมะพร้าว มีส่วนสำคัญ ในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสในพืชบางชนิดด้วยเช่นกัน

4. **แหล่งของคาร์บอน** ที่สำคัญได้แก่ น้ำตาลซูโครส หรือ แซคคาโรส ความเข้มข้น 2 - 4 %

5. **ปัจจัยสิ่งแวดล้อม** โดยเฉพาะแสงซึ่งต้องการความเข้มต่ำหรือไม่ใช้แสงเลย (เลี้ยงในที่มืด) อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังต้องการออกซิเจนเพื่อการหายใจของเซลล์

6. **สภาพอาหาร** แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งมักเจริญเติบโตได้น้อยและช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่าและตำแหน่งที่ชิ้นส่วนแคลลัสสัมผัสกับอาหารจะมีสารที่เป็นของเสียจากเมตาบอลิสมปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ และมีผลต่อการเจริญเติบโต

การชักนำให้เกิดแคลลัส

แคลลัส หมายถึง เซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มและยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์ไพเรนไคมาเพียงอย่างเดียว มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอลจำนวนมาก แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่นเรียกว่า compact callus ส่วนแบบที่เกาะกันหลวม ๆ เรียกว่า friable callus

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคลลัสส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุแต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ สีเหลืองจากแคโร-ทีนอยด์และฟลาโวนอยด์หรือสีม่วงจากแอนโทไซยานิน ทั้งนี้ปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหารและปัจจัยสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสง ชิ้นส่วนพืชเกือบทุกชนิดจากอวัยวะต่าง ๆ สามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่โดยทั่วไปแล้วในพืชใบเลี้ยงคู่ ส่วนใบเลี้ยง ส่วนที่อยู่เหนือใบเลี้ยง ราก ปลายยอด และส่วนที่อยู่ใต้ใบเลี้ยง จะประสบความสำเร็จจะสูง ส่วนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว คัพภะ ใบอ่อน ปลายยอด ดอกอ่อน และส่วนของเมล็ดที่เริ่มงอก จะให้ผลดีที่สุด

การชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสนั้น ส่วนใหญ่นิยมใช้สูตรอาหารที่มีธาตุอาหารหลักของ MS แต่ความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตอาจแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของพืช และชิ้นส่วนที่ใช้เลี้ยง ตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัสในพืชชนิดต่าง ๆ

ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชิ้นส่วนที่ใช้	สารควบคุมการเจริญเติบโต	
			ชนิด	µm
Acacea	Acacia koa	ปลายหน่อ	2,4-D	11.3 %
Onion	Allium sativum	ใบ	2,4-D	0.5
			IAA	11.7
			K	9.3
Anthurium	Anthurium andraeanum	ใบอ่อน	2,4-D	0.4
Asparagus	Asparagus officinalis	ยอด	NAA	5.4
			K	4.7
Tobacco	Nicotiana sylvestris	ใบ	2,4-D	0.45
Wheat	Triticum aestivum	เมล็ด คัพภะ	2,4-D	4.5 - 9
Carrot	Daucus carota	ราก ลำต้น	2,4-D	0.45
Tomato	Lycopersicon esculentum	ใบ	IAA	0.5 - 34.3
			BA	1 - 20
Coffea	Coffea arabica	ใบ	K	2
			2,4-D	2

ที่มา : Flick et al., 1983

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อควรพิจารณาในการเลี้ยงแคลลัส

ในการชักนำให้เกิดแคลลัส ชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อจะถูกนำไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารแข็งและต้องการเทคนิคการกดเพียงเบา ๆ ให้ชิ้นส่วนสัมผัสกับอาหารได้ดี ถ้าเป็นส่วนปลายรากจะเกิดแคลลัสได้ดีขึ้นถ้าวางราบลงบนอาหาร ขณะที่ชิ้นส่วนที่ตัดมาจากลำต้นควรวางในแนวตั้งให้ปลายที่ถูกตัดจมอยู่ในวุ้น

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงแคลลัส

1. การขยายพันธุ์ (micropropргation) โดยชักนำให้เกิดเป็นต้นที่ปราศจากโรคจำนวนมาก
2. การผลิตโปรโตพลาสต์ แคลลัสเหมาะในการนำไปย่อยผนังเซลล์ เนื่องจากมีสภาพปลอดเชื้ออยู่แล้วและเซลล์ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา
3. การผลิตสารเคมีที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิสม (secondary metabolite) ซึ่งบางชนิดสามารถนำไปใช้ในทางการแพทย์และอุตสาหกรรมได้
4. ผลิตพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด (polyploids) โดยใช้สารโคลชิซินชักนำ
5. การผลิตพืชทนทานหรือพืชต้านทาน เช่น ทนทานต่อสภาพดินเค็ม ดินเปรี้ยว อากาศร้อน หนาว หรือต้านทานสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ต้านทานต่อโรคและสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส
6. การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืช (cryopreservation)

น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย (Volatile oils) พบได้ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ดอก ใบ กลีบเลี้ยง ผล เป็นต้น ตามปกติน้ำมันหอมระเหยจะไม่มีสี แต่เมื่อทิ้งไว้นาน ๆ อาจถูกออกซิไดส์ทำให้สีเข้มขึ้น น้ำมันหอมระเหยเป็นสารประกอบเชิงซ้อนทางเคมีประกอบด้วยองค์ประกอบต่าง ๆ หลายอย่าง ซึ่งทำให้มีลักษณะกลิ่นและรสเฉพาะตัว

ประเภทของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยองค์ประกอบทางเคมีที่สลับซับซ้อน ซึ่งสามารถแบ่งน้ำมันหอมระเหยตามชนิดขององค์ประกอบใหญ่ ๆ ได้ดังนี้

1. Hydrocarbon volentile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลัก อาจพบได้ทั้งในรูปไฮโดรคาร์บอนโมโนไซคลิกเทอร์พีน (hydrocarbon monocyclic terpene) เช่น limonene ซึ่งพบได้ในน้ำมันมินต์ น้ำมันจากส้ม กระวาน น้ำมันสน และ *p*-cymene ซึ่งพบได้ในน้ำมันจากลูกผักชี อบเชย นอกจากนี้อาจพบไฮโดรคาร์บอนในรูปของไดไซคลิกโมโนเทอร์พีน (dicyclic monoterpene) เช่น pinene ซึ่งพบได้ในน้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันดอกส้ม และน้ำมันลูกผักชี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Alcohol volentile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญ ได้แก่ geriol citronellol ซึ่งเป็นอะไซคลิก แอลกอฮอล์ ส่วนเมนทอล และ ∝- terpieol เป็นโมโนไซคลิก เป็นต้น

3. Aldehyde volentile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกอัลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบหลัก น้ำมันหอมระเหยที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ที่สำคัญ ได้แก่ น้ำมันจากส้ม ตระไคร้หอม และมะนาว ตัวอย่างของอัลดีไฮด์ที่พบ ได้แก่ geranial neral และ citronellal

4. Ketone volentile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกคีโตนเป็นองค์ประกอบหลัก ตัวอย่างของคีโตนที่พบได้แก่ menthone carvone piperitone และ pulegone ซึ่งเป็นโมโนไซคลิกเทอร์พีน คีโตน นอกจากนี้ยังพบ camphor penchone และ thujone ซึ่งเป็นไดไซคลิก คีโตน น้ำมันหอมระเหยที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ การบูร และมินต์

5. Phenol volentile oils มีสารจำพวกฟีนอลเป็นองค์ประกอบหลัก ตัวอย่างได้แก่ น้ำมันโป๊ยกั๊ก พบสาร anethole น้ำมันจันทน์เทศ และ sassafras oil พบสาร safrole

6. Oxide volentile oils มีสารจำพวกออกไซด์เป็นองค์ประกอบหลัก ตัวอย่างของสารออกไซด์ที่พบในน้ำมันหอมระเหยในกลุ่มนี้ได้แก่ cineole ซึ่งพบในน้ำมันยูคาลิปตัส

7. Ester volentile oils มีสารจำพวกเอสเทอร์เป็นองค์ประกอบหลัก ตัวอย่างของสารจำพวกเอสเทอร์ที่พบได้แก่ allyl isothiocyanate พบในน้ำมันมัสตาด และเมธิลซาลิไซเลตพบได้ใน wintergreen oil

4. การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืช

การแยกน้ำมันหอมระเหยจากพืช ทำได้ 5 วิธีใหญ่ ๆ ดังนี้

วิธีที่ 1 การกลั่น (Distillation) แบ่งออกเป็น

1.1 กลั่นด้วยน้ำ (water distillation) วิธีนี้มักใช้กับพืชแห้ง และสารในพืชไม่สลายเมื่อถูกความร้อน เช่น การกลั่นน้ำมันสน

1.2 กลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ (water and steam distillation) ใช้กับพืชสด หรือพืชแห้งซึ่งอาจจะถูกทำลายได้ด้วยความร้อน เช่น การกลั่นน้ำมันหอมระเหยอบเชย การพลู โดยการหมักพืชในน้ำแล้วผ่านไอน้ำเข้าไป น้ำและน้ำมันจะถูกกลั่นออกมาด้วยกัน

1.3 กลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) ใช้กับพืชสด เช่น การกลั่นน้ำมันมินต์ ในระหว่างการกลั่นน้ำมันหอมระเหยที่อุณหภูมิสูง ๆ องค์ประกอบบางชนิดในน้ำมันหอมระเหยจะถูกย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(hydrolyze) ให้เกิดการสลายตัว การกลั่นที่ดีควรเลือกให้ไอน้ำกระจายตัว แทรกเข้าไปในพืชมากที่สุด แต่ทำให้เกิดการสลายตัวของสารต่าง ๆ น้อยที่สุด

วิธีที่ 2 โดยการบีบ (Expression)

น้ำมันหอมระเหยบางชนิด เช่น น้ำมันจากผิวส้ม น้ำมันจากผิวมะนาว จะสลายตัวได้เมื่อถูกความร้อน จึงใช้การบีบน้ำมันแทนการกลั่น

วิธีที่ 3 โดยใช้ Euflenrage

วิธีนี้เคยใช้มากในอุตสาหกรรมการทำน้ำหอม เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยในกลีบดอกไม้มักมีปริมาณน้อยจึงใช้การบีบไม่ได้ผล วิธีนี้ทำได้โดยใช้น้ำมันไม่ระเหยหรือไขมันชนิดที่ไม่มีกลิ่นนำมาแผ่เป็นฟิล์มบาง ๆ บนกระจก นำกลีบดอกไม้มาโปรยบนฟิล์มนี้ ตั้งทิ้งไว้ 2-3 ชั่วโมง แล้วเก็บกลีบดอกไม้ออก โปรยกลีบดอกไม้ชุดใหม่ลงไปแทน เพื่อให้ไขมันดูดซับน้ำหอมระเหยจากกลีบดอกไม้ไว้ จากนั้นนำไขมันที่ได้มาสกัดด้วยแอลกอฮอล์เพื่อแยกน้ำมันหอมระเหยออกมา

วิธีที่ 4 โดยการสกัด (Extraction)

ปัจจุบันในอุตสาหกรรมน้ำหอมจะใช้วิธีสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น เบนซิน หรือ ปิโตรเลียมอีเธอร์ โดยวิธีนี้น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จะมีกลิ่นคงเดิม เพราะไม่เกิดการสลายตัวเนื่องจากใช้อุณหภูมิต่ำ ข้อเสียของวิธีสกัดก็คือ ราคาแพง

วิธีที่ 5 Destructive distillation

ใช้กับการกลั่นน้ำมันจากต้นไม้ในวงศ์ Piraceae และ Cupressaceae โดยนำมาเผาในที่มีอากาศไม่เพียงพอจะเกิดการสลายตัวได้สารระเหยออกมา ซึ่งประกอบด้วยเมธิลแอลกอฮอล์ และ crude acetic acid

การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารอย่างประมาณใช้วิธีโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบาง (Pasto et al.,1979) เป็นวิธีการแยกสารออกจากกันได้สารบริสุทธิ์แต่ละตัว โดยจุดสารผสมลงบนผิวของวัฏภาคหยุดนิ่ง (stationary phase) และผ่านสารที่เป็นตัวพาสารต่าง ๆ เคลื่อนที่ไปเรียกว่า วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) สารที่ผสมกันในของผสมจะเคลื่อนที่ไปด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกันตามทิศทางของสารที่เป็นตัวพา การเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกันเนื่องจากวัฏภาคที่เคลื่อนที่กับสารผสมเกิดการกระทำต่อกันแบบใดแบบหนึ่งหรือหลายแบบปนกัน ซึ่งทำให้สารแยกออกจากกันได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโตกราฟี แบ่งตามกลไกการแยกได้ 4 แบบ ดังนี้

1. แอดซอร์พชั่น โครมาโตกราฟี (Adsorption Chromatography)

เป็นการแยกสารออกจากกัน ถ้าสารตัวใดถูกดูดซับบนผิวของวัฏภาคที่หยุดนิ่งได้ดีก็จะเคลื่อนที่ได้เร็ว ซึ่งการดูดซับของสารนี้ขึ้นกับความมีขั้วของโมเลกุลที่กระทำกับตัวดูดซับที่ผิวของของแข็งได้แน่น สารที่เป็นตัวดูดซับที่นิยมใช้เรียงตามความมีขั้วได้ดังนี้

เซลลูโลส > แป้ง > น้ำตาล > ซิลิกาเจล > แมกนีเซียม > ซิลิเกต > อลูมิเนียม > ออกไซด์ > ผงถ่าน

วิธีการทำที่อาศัยคุณสมบัติของแอดซอร์พชั่น โครมาโตกราฟี มีลักษณะเป็นแบบของเหลว - ของแข็ง และกาซ – ของแข็ง เช่น โครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบาง (Thin – layer chromatography) เป็นการแยกสารโดยใช้หลักของขบวนการดูดซับซึ่งตัวดูดซับเป็นชั้นบาง ๆ บนแผ่นซับพอร์ตเตอร์ เมื่อให้ตัวทำละลายซึมผ่านขึ้นไป สารแต่ละตัวจะเคลื่อนที่ได้เร็วแตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกออกจากกันได้ แผ่นที่แสดงการแยกออกจากกันเรียกว่า โครมาโตแกรม (Chromatogram) เราสามารถวัดค่า R_f ได้ดังนี้

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

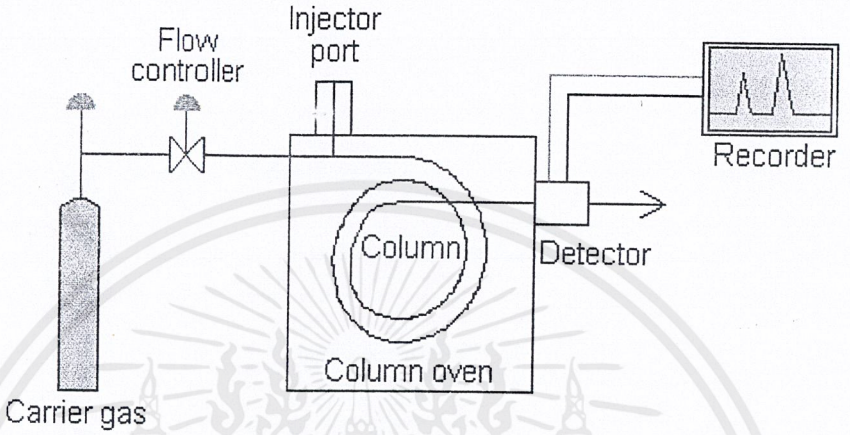
ค่า R_f เป็นค่าคงที่ทางฟิสิกส์ จะมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นกับสารที่เป็นตัวดูดซับ ตัวชะหรือตัวทำละลาย โครงสร้างโมเลกุลของสารตัวอย่าง และอุณหภูมิ (Heftmann,1975) ส่วนใหญ่ตัวดูดซับที่ใช้ในโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบาง คือ ซิลิกาเจล อลูมินา เซลลูโลส สำหรับตัวทำละลายที่ใช้ขึ้นกับลักษณะของตัวดูดซับและสารที่จะแยก เราสามารถใช้วิเคราะห์ในทางคุณภาพ วิเคราะห์โดยหาค่า R_f ของสารนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

2. พาร์ติชั่น โครมาโตกราฟี (Partition Chromatography)

เป็นการแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติการละลายของสาร ซึ่งสารแต่ละตัวมีความสามารถละลายในตัวทำละลายต่างกันขึ้นกับความมีขั้วของสาร สารแต่ละตัวมีความมีขั้วไม่เท่ากัน สารที่มีขั้วมากจะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วได้ดีกว่าพวกไม่มีขั้ว ดังนั้นจึงทำให้อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสารแต่ละตัวไม่เท่ากัน สารที่อยู่ในวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ดี จะออกมาได้ก่อน ส่วนสารที่อยู่ในวัฏภาคหยุดนิ่งได้ดี จะออกทีหลัง ตามลำดับ วิธีการที่อาศัยพาร์ติชั่น โครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีหลายแบบ เช่น ของแข็ง - ของแข็ง กาซ – ของแข็ง ของเหลว - ของเหลว ตัวอย่างที่นิยมคือ กาซโครมาโตรกราฟี ซึ่งเป็นวิธีการแยกของผสมที่ระเหยเป็นกาซ ผ่านตัวแยกที่เป็นวัฏภาคหยุดนิ่ง ดังรูปที่ 4



รูปที่ 2 แผนภาพเครื่องกาซโครมาโตกราฟี

ที่มา : http:// www.htc.de/technology/gc.html

มูลฐานของเครื่องมือ กาซโครมาโตกราฟี ที่สำคัญคือ คอลัมน์ ซึ่งมีตัวแยกสารบรรจุอยู่ และดีเทคเตอร์ ส่วนเพิ่มเติมที่สำคัญคือ ระบบกาซตัวพา ซึ่งเป็นกาซที่จะพาสารตัวอย่างให้เข้าไปในคอลัมน์และออกไปสู่ดีเทคเตอร์ ส่วนช่องสำหรับฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในคอลัมน์ และตัวบันทึกจะเป็นตัวบันทึกสัญญาณจากดีเทคเตอร์แล้วเขียนเป็นพีคที่เรียกว่า โครมาโตแกรม

การแยกสารจะประสบความสำเร็จได้ขึ้นกับองค์ประกอบที่สำคัญ 2 ประการ คือ

1. ขึ้นอยู่กับสารที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ คือ ตัวแยกสารมีสัดส่วนและขนาดที่พอเหมาะ รวมทั้งวิธีการบรรจุตัวแยกสารเข้าไปในคอลัมน์
2. รีโซลูชั่น คือ การแยกสารผสมตัวอย่างออกจากกันอย่างสมบูรณ์ ซึ่งขึ้นอยู่กับการเลือกคอลัมน์ที่เหมาะสม การควบคุมสภาวะและขนาดของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าเครื่อง

สารตัวอย่าง → ช่องฉีดสาร → คอลัมน์ → ดีเทคเตอร์ → ตัวบันทึก

↑

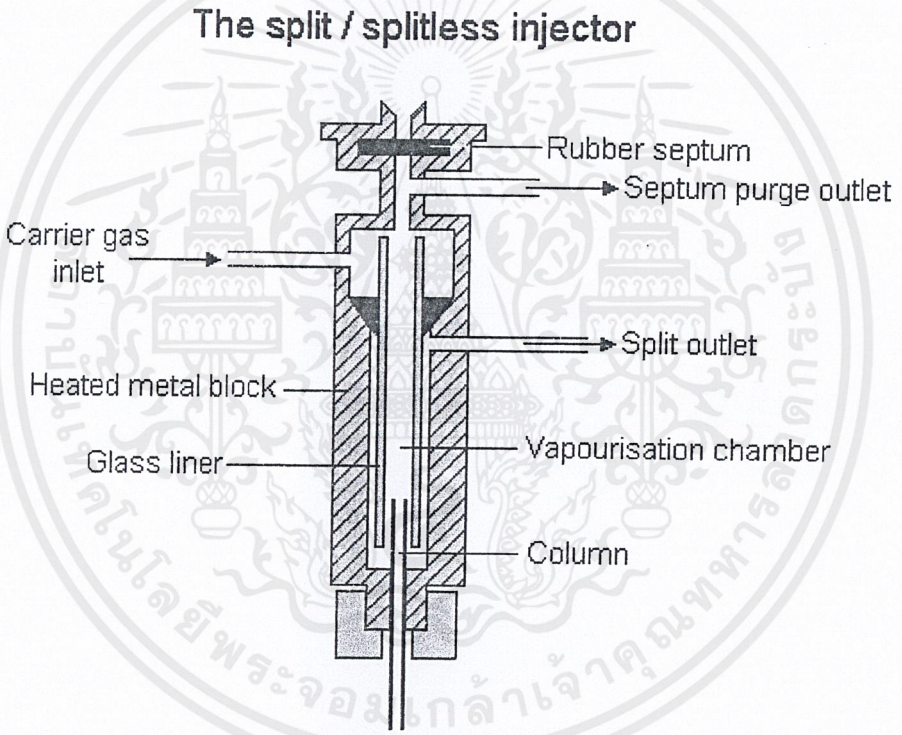
กาซตัวพา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบพื้นฐานของระบบกาซโครมาโตกราฟี

1. **กาซตัวพา** เป็นกาซที่ใช้เป็นตัวพาสารตัวอย่างจากช่องฉีดสารเข้าไปสู่คอลัมน์และออกไปสู่ดีเทคเตอร์ กาซตัวพาที่ใช้กันอยู่คือ ไฮโดรเจน ฮีเลียม และกาซไนโตรเจน

2. **ช่องฉีดสาร** เป็นส่วนที่สารตัวอย่างถูกฉีดด้วยไซริงค์ เพื่อเข้าสู่คอลัมน์โดยผ่านยางกันรั่ว ซึ่งช่องว่างระหว่างยางกันรั่วและคอลัมน์ต้องมีน้อยมาก ในทางปฏิบัติ ปลายของคอลัมน์ควรติดอยู่กับยางกันรั่วพอดีเพื่อให้สารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไปในคอลัมน์ทันที และช่องฉีดสารนี้ต้องให้ความร้อนพอที่จะระเหยสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไปในกรณีเป็นของเหลว และต้องมีอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิของคอลัมน์ประมาณ 10 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3 ช่องฉีดสาร

ที่มา : http:// www.htc.de/technology/gc.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. **คอลัมน์** ประกอบด้วยท่อที่บรรจุสารวัฏภาคที่หยุดนิ่ง วัฏภาคนี้อาจบรรจุอยู่ในท่อด้วยตัวของมันเองเป็นวัฏภาคที่เป็นของเหลว คอลัมน์นี้ปลายข้างหนึ่งติดกับช่องฉีดสารและปลายอีกข้างหนึ่งติดกับดีเทคเตอร์ ในการแยกสารที่มีจุดเดือดสูงจำเป็นต้องให้ความร้อนกับคอลัมน์เพื่อให้สารตัวอย่างเป็นไออยู่ตลอดเวลา ดังนั้นคอลัมน์นี้จึงต้องอยู่ในตู้ให้ความร้อนที่เรียกว่า โอเวน

4. **ดีเทคเตอร์** คือ เครื่องมือที่ทำการวัดจำนวนสารตัวอย่างที่แยกโดยคอลัมน์และถูกพามาด้วยกาซตัวพา ดีเทคเตอร์ต้องมีความร้อนพอที่จะระเหยสารตัวอย่างที่ผ่านเข้ามาและออกไปโดยไม่ให้ตกค้างอยู่ในดีเทคเตอร์ อุณหภูมิต้องสูงกว่าอุณหภูมิของคอลัมน์ประมาณ 10 องศาเซลเซียส

4.1 เทอร์มอล คอนดัคติวิตี ดีเทคเตอร์ (Thermal Conductivity Detector : T.C.D)

หลักการ คือ สารตัวอย่างที่ถูกแยกจากคอลัมน์แล้วพร้อมด้วยกาซตัวพา จะเข้าไปในดีเทคเตอร์ผ่านขดลวดซึ่งทำให้ร้อนด้วยกระแสไฟฟ้าปริมาณหนึ่ง ขดลวดจะเสียความร้อนให้กับกาซที่เข้ามา ดีเทคเตอร์จะปรับกระแสไฟฟ้าให้ขดลวดมีความร้อนเท่าเดิม กระแสไฟฟ้าที่ใช้ปรับความร้อนนี้จะเป็นสัญญาณส่งเข้าตัวบันทึก

4.2 เฟรม ไอออนไนเซชั่น ดีเทคเตอร์ (Frame ionization detector)

ส่วนสำคัญคือ อิเลคโทรด (electrode) และเฟรม ตัวอิเลคโทรดมี 2 อัน มีค่าความต่างศักย์จำนวนหนึ่ง (300 โวลต์) ส่วนที่สำคัญ เรียกว่า คอลเลคชั่น อิเลคโทรด (collection electrode) จะอยู่เหนือเฟรมเพื่อคอยรับประจุที่เกิดขึ้นเนื่องจากการไอออไนซ์ เกิดอนุภาคที่มีประจุและอิเลคตรอน ซึ่งจะวิ่งไปยังคอลเลคชัน อิเลคโทรด เกิดเป็นกระแสไฟฟ้าขยายเป็นสัญญาณส่งไปบันทึกที่ตัวบันทึก

3. เอกซ์คลูชั่น โครมาโตกราฟี (Exclusion Chromatography)

เป็นการแยกสารโดยใช้สารที่เป็นวัฏภาคที่หยุดนิ่ง โดยมีรูหรือช่องที่พอเหมาะกับขนาดของโมเลกุลที่จะผ่านเข้าและออกมาได้ โมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่าขนาดของช่องกาซจะสามารถผ่านออกมาได้เร็วกับวัฏภาคที่เคลื่อนที่ โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะผ่านออกมาได้ช้าลง ตามลำดับ สารที่ใช้เป็นวัฏภาคที่หยุดนิ่ง ได้แก่ พวกซิลิเกต

4. ไอออน-เอกซ์เชนจ์ โครมาโตกราฟี (Ion-Exchange Chromatography)

เป็นการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างสารกับวัฏภาคที่หยุดนิ่ง วัฏภาคที่หยุดนิ่งที่เป็นกรดสามารถให้โปรตอนได้ง่ายกับด่างที่อยู่ในวัฏภาคที่เคลื่อนที่ เกิดเป็นแคทไอออน-แอนไอออน ซึ่งจะจับกันแข็งแรงมากกว่าสารตัวอื่น ๆ จำนวนโปรตอนที่ให้ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นด่างของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพรา

เมื่อนำต้นและใบสดของกะเพรามาสกัดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ จะได้น้ำมันที่มีสีเหลือง มีคุณสมบัติทางกายภาพ (วรพงษ์,2523) ดังต่อไปนี้

specific gravity ที่ 20 องศาเซลเซียส = 0.959

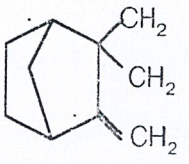
refractive index ที่ 20 องศาเซลเซียส = 1.520

specific rotiation = +0.09 องศาเซลเซียส

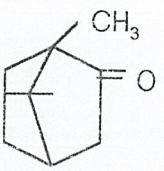
องค์ประกอบในน้ำมันจากกะเพราประกอบด้วย

1. α-amorphene
2. borneol
3. δ-cadinene
4. γ-cadinene
5. calamenene
6. camphene
7. caryophyllene
8. iso-caryophyllene
9. caryophyllene oxide
10. 1,8-cineol
11. copaene
12. α-cubebene
13. p-cymene
14. β-elemene
15. eugenol
16. germacrene D
17. γ-humulene
18. limonene
19. linalool
20. methyl chavicol
21. methyl eugenol
22. α-pinene
23. β-pinene
24. sabinene
25. α-selinene
26. γ-terpinene
27. terpinolene

โครงสร้างเคมีของสารบางชนิดที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา



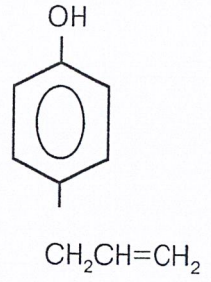
camphene



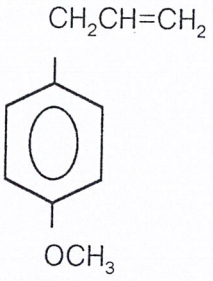
camphor

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



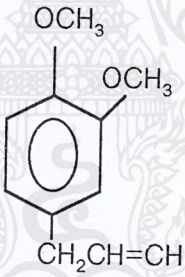
eugenol



methyl chavicol

องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยของในกะเพรา คือ เมธิลยูจินอล โครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 4 มีสูตรโมเลกุลเป็น C_{11} H_{14} O_2 (Ernest,1992) องค์ประกอบย่อย ได้แก่ methyl chavicol camphor camphene

มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเรื่องยูจีนอลมานานกว่า 100 ปี และได้มีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมจนสามารถทราบถึงโครงสร้างและคุณสมบัติของยูจีนอลเป็นอย่างดี แต่ไม่มีหลักฐานแสดงไว้ว่ายูจีนอลถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อใด



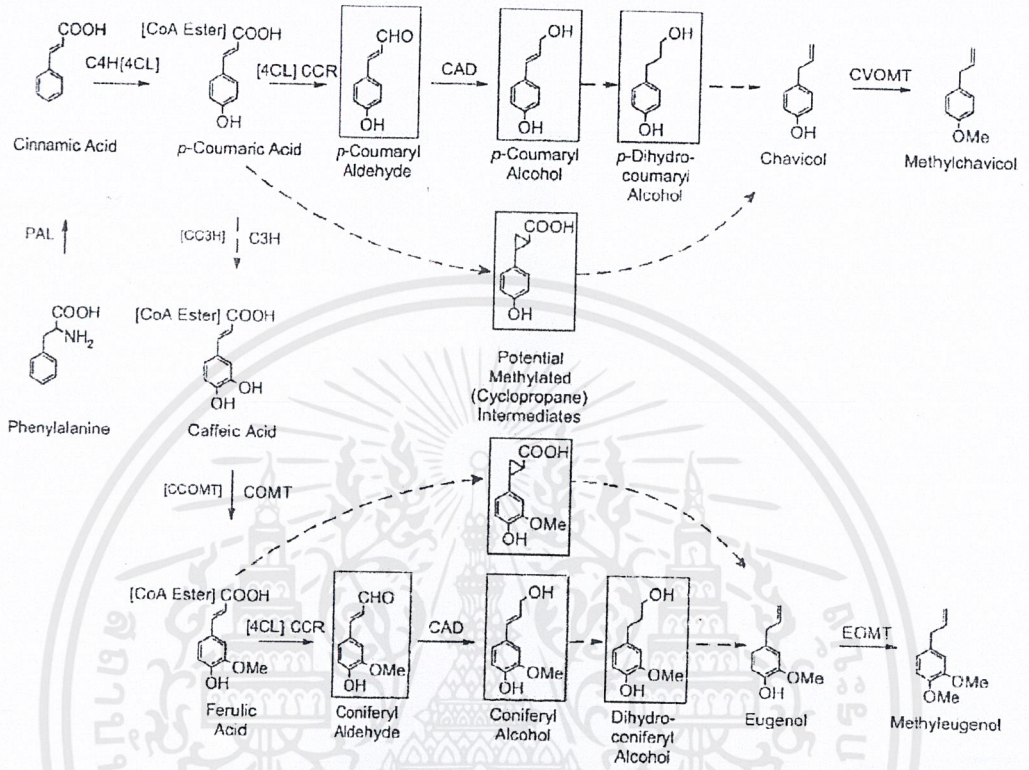
รูปที่ 4 แสดงสูตรโครงสร้างของเมธิลยูจีนอล น้ำหนักโมเลกุล 164.20

ยูจีนอลมีชื่อเรียกได้หลายอย่าง คือ 4-allyl-2-methoxyphenol 4-allylauaiacol หรือ 2-methoxy-4-(2-propenyl)-phenol เป็นต้น ยูจีนอลในธรรมชาติมักจะได้จากน้ำมันหอมระเหยของดอกและใบการพลู ใบอบเชย และใบยี่หร่า (*Ocimum gratirsimum)* พันธุ์บราซิล เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบในพืชเครื่องเทศอื่น ๆ อีก แต่มีปริมาณน้อยหรืออยู่ในรูปเมธิลอีเธอร์ยูจีนอล ซึ่งมีรายงานว่าพบอยู่ในพืชพวกกะเพรา กุหลาบและการบูร เป็นต้น ในทางกาค้าน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูมักใช้แทนยูจีนอลบริสุทธิ์ น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูประกอบด้วยยูจีนอล ถึง 80-95 เปอร์เซนต์ (Bedoukian,1967)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

43969

วิถีการสังเคราะห์เมธิลยูจีนอล แสดงดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 วิถีการสังเคราะเมธิลยูจีนอล

ที่มา : Gang et al., 2001

คุณสมบัติทางฟิสิกส์ของยูจีนอล

ยูจีนอลเป็นน้ำมันใสไม่มีสีหรือมีสีเหลืองอ่อน ๆ ละลายน้ำได้น้อยมาก แต่สามารถรวมตัวกับแอลกอฮอล์และน้ำมันได้ในโพรไพลีนไกลคอล และสารละลายอัลคาไลด์ที่เจือจาง ความหนืดและสีของยูจีนอลจะขึ้นอยู่กับอายุการเก็บรักษา การสัมผัสกับอากาศและแสงของยูจีนอลเองมีความถ่วงจำเพาะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 1.0651 ดรรชนีการหักเหของแสง (20/D) 105410 จุดเดือดที่ความดัน 760 มิลลิเมตรปรอท 253 องศาเซลเซียส จุดวาบไฟ 110 องศาเซลเซียส และสามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซนต์ โดยปริมาตรด้วยอัตราส่วน 1:5 ถึง 6 ส่วน (Bedoukain,1976)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัย

ในปี ค.ศ. 1968 Pogany และคณะ (Pogany et.al.,1968) ได้วิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยของโหระพา โดยนำมาแยกด้วยวิธีกาซโครมาโตกราฟีและศึกษาคุณสมบัติของช่วงเวลาในการเก็บรักษา พบว่าน้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยสารเคมี 32 ชนิด สารสำคัญที่วิเคราะห์ได้ เช่น camphor beta-methoxy benzaldehyde methyl- eugenol นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณสารเคมีที่พบในน้ำมันหอมระเหยของโหระพาจะแตกต่างกันไปในพืชที่ปลูกในบริเวณอุณหภูมิต่างกัน

ในปี ค.ศ. 1999 Nirmal K, Singh และ C.B. Sehgal (Nirmal K. et al.,1999) ได้ศึกษาการขยายพันธุ์ของกะเพรา (*Ocimum sanctum Linn.*) ในหลอดทดลอง พบว่าเมื่อนำชิ้นส่วนกะเพราที่เลี้ยงในอาหาร MS มาเลี้ยงในอาหาร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D จะผลิตแคลลัสแบบ non-morphogenetic เพียงอย่างเดียว และจะเกิดรากเมื่อเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย 6-benzyl aminopurine (BAP) เป็นเวลา 2-3 อาทิตย์ ในการทดลองเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่า 92 % มีการพัฒนาไปเป็นรากและ ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมื่อนำไปปลูกในดินพบว่า 85 % สามารถเจริญอย่างปกติ

ในปี ค.ศ. 2000 Begum และคณะ (Begum et al.,2000) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการนำปลายรากจากต้นกะเพรามาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองโดยเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0.1-2.0 มก./ล.เพื่อชักนำให้พัฒนาไปเป็นต้น แล้วทำการชักนำให้เกิดเป็นรากโดยย้ายไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.1 มก./ล. พบว่าต้นที่ได้เมื่อย้ายปลูกในดินมีเปอร์เซนต์การรอด 70 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. เมล็ดกะเพรา (*Ocimum sanctum Linn.*)
   (คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)

2. สารเคมี
   2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารแข็งสูตร MS
   2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต
   - NAA (naphthaleneacetic acid)
   - BA (N_6-Benzyladenin)

   2.3 สารเคมีที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อ
   - สารละลายคลอรอกซ์

   2.4 เอธิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ แอลกอฮอล์ 95 และ 70 เปอร์เซนต์
   2.5 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดสาร
   - สารละลายอะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)

   2.6 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการวิเคราะห์ TLC และ GC
   - สารละลายมาตรฐานยูจีนอล (Eugenol)
   - สารละลายมาตรฐานลินาโลออล (Linalool)
   - สารละลายมาตรฐานไพนีน (α-pinene)
   - สารละลายคลอโรฟอร์ม (Chloroform)
   - สารละลายอะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)

3 อุปกรณ์ที่ใช้
   3.1 ประเภทเครื่องแก้ว
   - บีกเกอร์
   - ขวดรูปชมพู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ไมโครปิเปตต์และทิปขนาดต่าง ๆ
- ช้อนตักสาร
- มีดผ่าตัดแบบต่าง ๆ
- ปากคีบ
- เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบหยาบและละเอียด
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH-meter)
- เตาอบไมโครเวฟ
- ตู้เย็น
- เตาอบความร้อน (Hot air oven)
- หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air-flow cabinet)
- อุปกรณ์การถ่ายภาพ
- เครื่องโฮโมจิไนเซอร์ (Homoginizer)
- เครื่องระเหยสารภายใต้สูญญากาศ (Rotary evaporator) (Laboratoriumstechnik AG CH-9230 Flawili Schweiz, Switzerland)
- เครื่องวิเคราะห์กาซโครมาโตกราฟี (GC) (Shimadzu รุ่น GC-17A System BARA, windsor & Co., LTD, USA.)
- คอลัมน์ DB-FFAP ยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร (narrow bore)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เข็มฉีดยาไมโครลิเตอร์ # 701 ขนาด 10 ไมโครลิตร (Hamilton company, USA)
- ดีเทคเตอร์ชนิดเฟรม ไอออไนเซชั่น (Flam Ionization Detector, FID)
- ชุดอุปกรณ์โครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) ประกอบด้วยโถแก้ว หลอดแก้ว (capillary tube) และแผ่นซิลิกาเจล
- เครื่องฉายรังสียูวี (Ultraviolet fluorescence analysis)

4. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งควบคุมการให้แสงที่ความเข้มแสง 700 ลักซ์ โดยใช้หลอดฟลูออ - เรสเซนต์ (Philips TLD36W/54+61) ช่วงสว่าง 16 ชั่วโมง ช่วงมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีดำเนินการทดลอง

แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เพิ่มปริมาณต้นกะเพราโดยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสังเคราะห์สูตร MS

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาระดับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบในอาหาร MS 16 สูตร ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ดังตารางที่ 2 ทำการคัดเลือกสูตรอาหารและเพิ่มปริมาณแคลลัสในอาหารสูตรที่เลือก

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากต้นกะเพราที่มีตามตลาด ต้นกะเพราที่ปลูกโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และแคลลัสที่เกิดจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบของต้นกะเพราที่ปลูกโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบางและกาซโครมาโตกราฟี

ขั้นตอนที่ 4 เก็บรวบรวมผลการทดลองและวิเคราะห์ผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลองโดยละเอียด

ขั้นตอนที่ 1 เพิ่มปริมาณต้นกะเพราโดยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารสังเคราะห์ MS

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. ขั้นตอนการเตรียมอาหาร
    1.1 นำอาหารผงสำเร็จรูป MS มาละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ขวดสีชาขวดละ 100 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด
    1.2 นำสารละลายอาหาร MS ในขวดสีชามาเติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร
    1.3 ปรับปริมาตรสารละลายอาหาร MS ด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายอาหารมาปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ให้ได้พีเอชประมาณ 5.6 – 5.8
    1.4 เติมวุ้นผง 8 กรัมต่อลิตร แล้วหลอมละลายวุ้นโดยใช้เตาไมโครเวฟ
    1.5 เทอาหารลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดละประมาณ 20 มิลลิลิตร
    1.6 นึ่งฆ่าเชื้อขวดอาหารในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ด
    2.1 นำเมล็ดกะเพราใส่ลงใน microcentrifuge tube ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ประมาณ 50 - 100 เมล็ด
    2.2 เติมสารละลายคลอรอกซ์ลงใน microcentrifuge tube ประมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่า 10 -15 นาที
    2.3 เมื่อครบกำหนดเวลาใช้ไมโครปิเปตต์ดูดเอาสารละลายคลอรอกซ์ออก และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อล้างเมล็ด 5 - 7 ครั้ง เขย่าครั้งละ 5 -10 นาที
    2.4 เทเมล็ดกะเพราที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อลงบนจาน petri-dish ที่มีกระดาษทิชชูผ่านการฆ่าเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง
    2.5 ใช้ปากคีบที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ย้ายเมล็ดลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้
    2.6 นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาวางเรียงบนชั้น ที่ให้แสง 16 ชั่วโมง มืด 8 ชั่วโมง ความเข้มแสง 700 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาระดับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบในอาหาร MS 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 1,000 มิลลิลิตรและเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ในอาหาร MS ทั้ง 16 สูตร ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงอัตราส่วนระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA (มก./ล.) และ BA (มก./ล.) ในอาหาร MS ทั้ง 16 สูตร

BA \ NAA	0.1 มก./ล.	0.5 มก./ล.	1.0 มก./ล.	1.5 มก./ล.
0.1 มก./ล.	1	2	3	4
0.5 มก./ล.	5	6	7	8
1.0 มก./ล.	9	10	11	12
1.5 มก./ล.	13	14	15	16

   1.3 จากนั้นนำสารละลายอาหารมาปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ให้ได้พีเอชประมาณ 5.6 – 5.8
   1.4 เติมวุ้นผง 8 กรัมต่อลิตร แล้วหลอมละลายวุ้นโดยใช้เตาไมโครเวฟ เทอาหารลงในภาชนะที่จะใช้เลี้ยง คือ ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดละประมาณ 20 มิลลิลิตร
   1.5 นึ่งฆ่าเชื้อขวดอาหารในหม้อนึ่งความดันไอน้ำโดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ขั้นตอนการชักนำให้เกิดแคลลัส

2.1 นำต้นกะเพราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS อายุประมาณ 14 วัน มาตัดแบ่งเป็นส่วนยอดและลำต้นใต้ใบเลี้ยง โดยส่วนยอดจะนำมาปักลงในอาหาร MS ขวดใหม่เพื่อเพิ่มปริมาณ และขนาดต้นกะเพรา

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

2.3 ส่วนของใบนำมาวางบนอาหารสังเคราะห์ 16 สูตร ขวดอาหารละ 2 ชิ้น โดยจะทำการทดลองระดับความเข้มข้นสูตรละ 5 ซ้ำ

2.4 สังเกตการเจริญเติบโต ลักษณะของแคลลัสจากส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง ในอาหารแต่ละสูตร ทุก ๆ 7 วัน บันทึกผลการทดลอง

2.5 คัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของแคลลัสจากลำต้น เพิ่มปริมาณแคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่คัดเลือกไว้

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากต้นกะเพรา แคลลัสที่เกิดจากส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบกะเพรา

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. ขั้นตอนการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากต้นกะเพรา และแคลลัสที่เกิดจากส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง

1.1 ขั้นตอนการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากต้นกะเพรา

1.1.1 นำต้นกะเพราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS มีอายุประมาณ 50 วัน มาชั่งน้ำหนักประมาณ 10 กรัม

1.1.2 เติมสารละลายอะซิโตไนไตรล์ 200 มิลลิลิตร และนำมาปั่นให้ละเอียดโดยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์

1.1.3 นำสารละลายส่วนใสมาใส่ในขวดก้นกลมแล้วนำไประเหยโดยใช้เครื่องระเหยสารภายใต้สูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

1.1.4 นำขวดก้นกลมมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณสารหลังขั้นตอนการสกัด

1.1.5 เติมสารละลายอะซิโตไนไตรล์ลงในขวดก้นกลม 1-3 มิลลิลิตร เพื่อละลายสารที่ติดอยู่ที่ก้นขวด แล้วนำสารละลายมาเก็บในขวดขนาดเล็กที่มีจุกปิดและห่อฟอยล์เก็บไว้ไม่ให้โดนแสงแดด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ขั้นตอนการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากแคลลัส

1.2.1 นำแคลลัสที่ได้จากลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่มีอายุประมาณ 50 วัน มาชั่งน้ำหนักให้ได้อย่างละประมาณ 10 กรัม แล้วแบ่งใส่บีกเกอร์ 2 ใบ

1.2.2 เติมสารละลายอะซิโตไนไตรล์ 200 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์แต่ละใบและนำมาปั่นให้ละเอียดโดยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์

1.2.3 นำสารละลายส่วนใสมาใส่ในขวดก้นกลมแล้วนำไประเหย โดยใช้เครื่องระเหยสารภายใต้สูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

1.2.4 นำขวดก้นกลมมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณสารหลังขั้นตอนการสกัด

1.2.5 เติมสารละลายอะซิโตไนไตร์ทลงในขวดก้นกลม 1-3 มิลลิลิตร เพื่อละลายสารที่ติดอยู่ที่ก้นขวดแล้วนำสารละลายมาเก็บในขวดขนาดเล็กที่มีจุกปิดและห่อฟอยล์เก็บไว้ไม่ให้โดนแสงแดด

2. ขั้นตอนการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย

2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบาง

2.1.1 เตรียมตัวทำละลายในโถแก้ว 100 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลายคลอโรฟอร์มและสารละลายอะซิโตไนไตรล์ในอัตราส่วน 7 : 3 จากนั้นนำกระดาษกรองมาวางไว้ที่ผนังรอบ ๆ ด้านในโถ และจุ่มลงในตัวทำละลายเพื่อให้ในโถแก้วอิ่มตัวไปด้วยไอของตัวทำละลายตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

2.1.2 ดูดสารละลายเข้มข้นที่ได้จากการสกัดโดยใช้ capillary tube แล้วนำมาจุดลงบนแผ่นซิลิกาเจล ซึ่งเป็น stationary phase และจุดสารละลายมาตรฐานเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบกับสารที่แยกออกมาโดยแต่ละจุดห่าง 1.5 เซนติเมตร

2.1.3 นำแผ่นซิลิกาเจล ที่มีจุดของสารตัวอย่างไปวางตั้งไว้ในโถแก้วที่มีตัวทำละลาย (ตัวทำละลายต้องไม่ท่วมจุดตัวอย่าง) mobile phase จะเคลื่อนที่ผ่านซิลิกา เจล จนเกือบถึงขอบแผ่นซิลิกาเจล จากนั้นนำแผ่นซิลิกาเจล ออกมาขีดเส้นในตำแหน่งที่ mobile phase หยุดเคลื่อนที่ (solvent front)

2.1.4 นำแผ่นซิลิกาเจล มาวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยโดยนำไปใส่ในตู้ฉายรังสี UV เพื่อดูการเรืองแสงของสารที่แยกได้ถ้าสารที่แยกออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่สามารถเรืองแสงได้ ให้นำแผ่นซิลิกาเจล มาพ่นด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นซึ่งจะทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบของสารที่แยกออกมาทำให้เกิดความร้อนขึ้น จะเห็นเป็นจุดสีน้ำตาลบนแผ่นซิลิกาเจล

2.1.5 หาค่า R_f เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารแต่ละชนิด

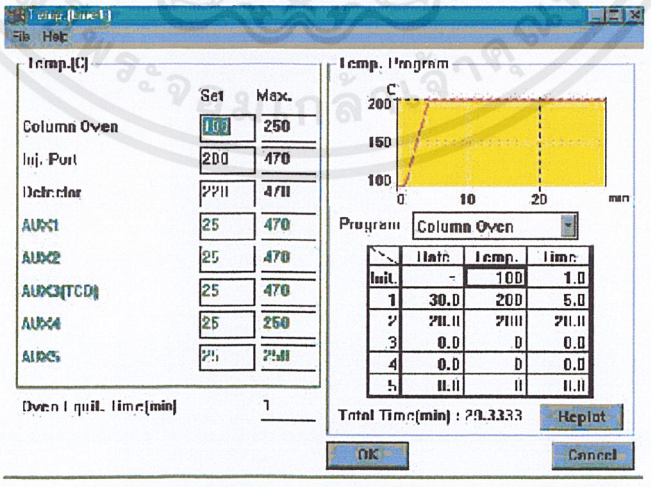
2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยโดยเทคนิคกาซโครมาโตกราฟี

2.2.1 การเตรียมเครื่องกาซโครมาโตกราฟี

2.2.1.1 การปรับอัตราการไหลของกาซ โดยให้อัตราการไหลของกาซไนโตรเจน 50 มิลลิลิตรต่อนาที ไฮโดรเจน 50 มิลลิลิตรต่อนาที และอากาศ 250 มิลลิลิตรต่อนาที

2.2.1.2 การปรับอุณหภูมิและสภาวะของเครื่อง (ดังรูปที่ 6) กำหนดให้

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



รูปที่ 6 การปรับอุณหภูมิและการตั้งค่าเครื่องกาซโครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้เครื่องกาซโครมาโตกราฟี

นำสารสกัดอย่างหยาบที่สกัดได้จากต้นกะเพรา แคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงมาละลายด้วยสารละลายอะซิโตไนไตรล์ ฉีดตัวอย่างเข้าไปในช่องฉีดสารครั้งละ 1 ไมโครลิตร คอลัมน์ที่ใช้ คือ DB-FFAP ยาว 30 เมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร (narrow bore) โดยมีฮีเลียมเป็นกาซตัวพา ใช้ดีเทคเตอร์แบบเฟลมไอออนไนเซชั่น

2.2.3 การตรวจสอบโครมาโทแกรมของสารตัวอย่าง

2.2.3.1 ฉีดสารละลายมาตรฐานยูจีนอล ลินาโลออลและไพนีน ครั้งละ 1 ไมโครลิตร

2.2.3.2 เปรียบเทียบโครมาโตแกรมที่ได้จากสารละลายมาตรฐานแต่ละตัว กับสารตัวอย่างที่สกัดได้จากต้นกะเพรา แคลลัสจากลำต้นใต้ใบเลี้ยง

2.2.3.3 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารจากโครมาโตแกรมและบันทึกผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

จากการนำเมล็ดกะเพรามาฟอกฆ่าเชื้อ และเพาะลงอาหาร MS เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต และนำมาสกัดสารเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบ มีผลดังนี้

4.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกะเพรา

4.1.1 การเพาะเมล็ดกะเพราให้งอกเป็นกล้าในสภาพปลอดเชื้อ

เริ่มจากการนำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาวางบนอาหาร MS เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต แล้วนำไปวางบนชั้นในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความเข้มแสง 700 ลักซ์ การเจริญเติบโตของกล้ากะเพราแสดงในรูปที่ 7

ก. ข. ค.

รูปที่ 7 การพัฒนาเป็นกล้าที่อายุต่าง ๆ ของเมล็ดกะเพราในอาหาร MS

7 ก. กล้ากะเพราอายุ 25 วัน

7 ข. กล้ากะเพราอายุ 40 วัน

7 ค. กล้ากะเพราอายุ 50 วัน

การปลูกกะเพราในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น มีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้าอาจเนื่องมาจากอุณหภูมิและแสงที่ควบคุมในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกะเพรา จึงได้ทดลองนำต้นกะเพราไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียสและกำหนดความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ให้แสง 12 ชั่วโมง มืด 12 ชั่วโมง พบว่าต้นกะเพรามีการเจริญเติบโตดีกว่ากะเพราที่เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปกติ ดังแสดงในรูปที่ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. ข.

รูปที่ 8 อิทธิพลของความเข้มแสงต่อการเจริญของกล้ากะเพรา
8 ก. กล้ากะเพราอายุ 50 วัน เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์
8 ข. กล้ากะเพราอายุ 50 วัน เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 700 ลักซ์

4.1.2 การคัดเลือกสูตรอาหาร MS ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส

เมื่อเพาะเมล็ดกะเพราบนอาหาร MS จนมีอายุ 14 วันแล้วจะชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส โดยตัดส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงมาวางบนอาหาร MS ทั้ง 16 สูตร ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ในปริมาณแตกต่างกัน (ตารางที่ 2) ลักษณะและน้ำหนักของแคลลัสในแต่ละสูตร แสดงดังตารางที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ลักษณะและน้ำหนักของแคลลัสอายุ 50 วัน จากส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงในสูตรอาหาร 16 สูตร

สูตร	ขนาดแคลลัส	การพัฒนาไปเป็นต้น*	การพัฒนาไปเป็นราก	น้ำหนักสด(กรัม)
1	+	มี	ไม่มี	0.210
2	+	มี	ไม่มี	0.192
3	+	มี	มี	0.207
4	+	มี	ไม่มี	0.233
5	+	ไม่มี	ไม่มี	0.351
6	+++	มี	มี	0.534
7	+++	ไม่มี	ไม่มี	0.492
8	++	ไม่มี	มี	0.292
9	++	ไม่มี	มี	0.301
10	+++	มี	ไม่มี	0.562
11	++	มี	มี	0.321
12	+++	ไม่มี	มี	0.430
13	+++	ไม่มี	มี	0.445
14	+++	ไม่มี	มี	0.523
15	+++	ไม่มี	มี	0.490
16	+++	ไม่มี	มี	0.582

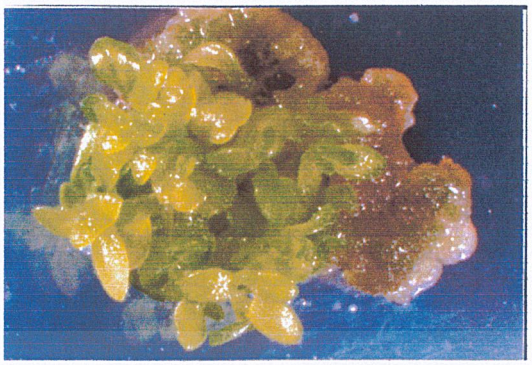
\+ หมายถึง แคลลัสที่มีน้ำหนักระหว่าง 0.100-0.249 กรัม

++ หมายถึง แคลลัสที่มีน้ำหนักระหว่าง 0.250-0.399 กรัม

+++ หมายถึง แคลลัสที่มีน้ำหนักระหว่าง 0.400-0.600 กรัม

* หมายเหตุ แคลลัสที่กำลังพัฒนาไปเป็นต้น ดังรูปที่ 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 แคลลัสในอาหาร MS สูตร 4 ที่กำลังพัฒนาไปเป็นต้น ถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงใช้น้ำหนัก รวมทั้งการพัฒนาไปเป็นต้นและรากเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือก ซึ่งสูตรที่คัดเลือก คือ สูตร 10 (BA 1.0 มก./ล. NAA 0.5 มก./ล.) มีการพัฒนาไปเป็นต้น และสูตร 16 (BA 1.5 มก./ล. NAA 1.5 มก/ล.) มีการพัฒนาไปเป็นราก ดังรูปที่ 10

ก. ข.

รูปที่ 10 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสกะเพราไปเป็นต้น และ/หรือ ราก

10 ก. การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสกะเพราในอาหาร MS สูตรที่ 10

10 ข. การพัฒนาไปเป็นรากของแคลลัสกะเพราในอาหารMS สูตรที่ 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การสกัดน้ำมันหอมระเหย

นำต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลองอายุ 50 วัน มาสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย คือ อะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 200 มล. ต่อน้ำหนักสดกะเพรา 10 กรัม จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ ให้ละเอียด นำส่วนใสที่ได้ใส่ขวดก้นกลมแก้วแล้วนำไประเหยโดยใช้เครื่องระเหยสารภายใต้สุญญากาศ ส่วนที่เหลือจากการระเหย เรียก สารสกัดอย่างหยาบ (crude extract) ในส่วนการสกัดต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ แคลลัสสูตร 10 และสูตร 16 นั้น จะทำการทดลองวิธีเดียวกับการสกัดต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง ผลการสกัดแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของสารสกัดอย่างหยาบ (crude extract) จากกะเพราที่ใช้ในการวิเคราะห์โครมาโตกราฟี

ประเภท	น้ำหนักก่อนสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดอย่างหยาบ (กรัม)	ความเข้มข้นสาร (มก./มล.)
ต้นเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ	10.176	0.055	27.5
ต้นเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง	10.160	0.053	26.5
แคลลัสสูตร 10	10.286	0.035	17.5
แคลลัสสูตร 16	10.350	0.040	20.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1 การวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบาง (TLC)

นำสารสกัดอย่างหยาบที่ได้มาทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน โดยใช้ mobile phase คือ คลอโรฟอร์มและอะซิโตไนไตรล์ในอัตราส่วน 7:3 เป็น mobile phase ตามวิธีการทดลองขั้นที่ 2.1.1 ดังแสดงในรูปที่ 11 12 และ 13 ตามลำดับ

รูปที่ 11 แถบสารบนโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบาง หลังจากพ่นกรดซัลฟิวริกเข้มข้น
แถบ A สารสกัดจากแคลลัส
แถบ B สารสกัดจากต้น
แถบ C สารละลายมาตรฐานยูจีนอล

จากรูปที่ 11 แถบ A B และ C แสดงการเคลื่อนที่ขององค์ประกอบต่าง ๆ ของสาร ซึ่งพบว่าแถบ A และBมีองค์ประกอบของสารอยู่หลายประเภท วิเคราะห์โดยใช้คุณสมบัติหลายประการ คือ ความสามารถในการละลายในตัวทำละลาย ซึ่งเป็น mobile phase และการถูกดูดซับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยซิลิกาเจลซึ่งเป็น stationary phase ได้แตกต่างกันทำให้เราสามารถเห็นแถบสีของสารต่าง ๆ ได้ที่ระยะแตกต่างกัน รวมทั้งใช้คุณสมบัติของการที่สารต่าง ๆ สามารถทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกเข้มข้น แล้วเกิดสีแตกต่างกันด้วย

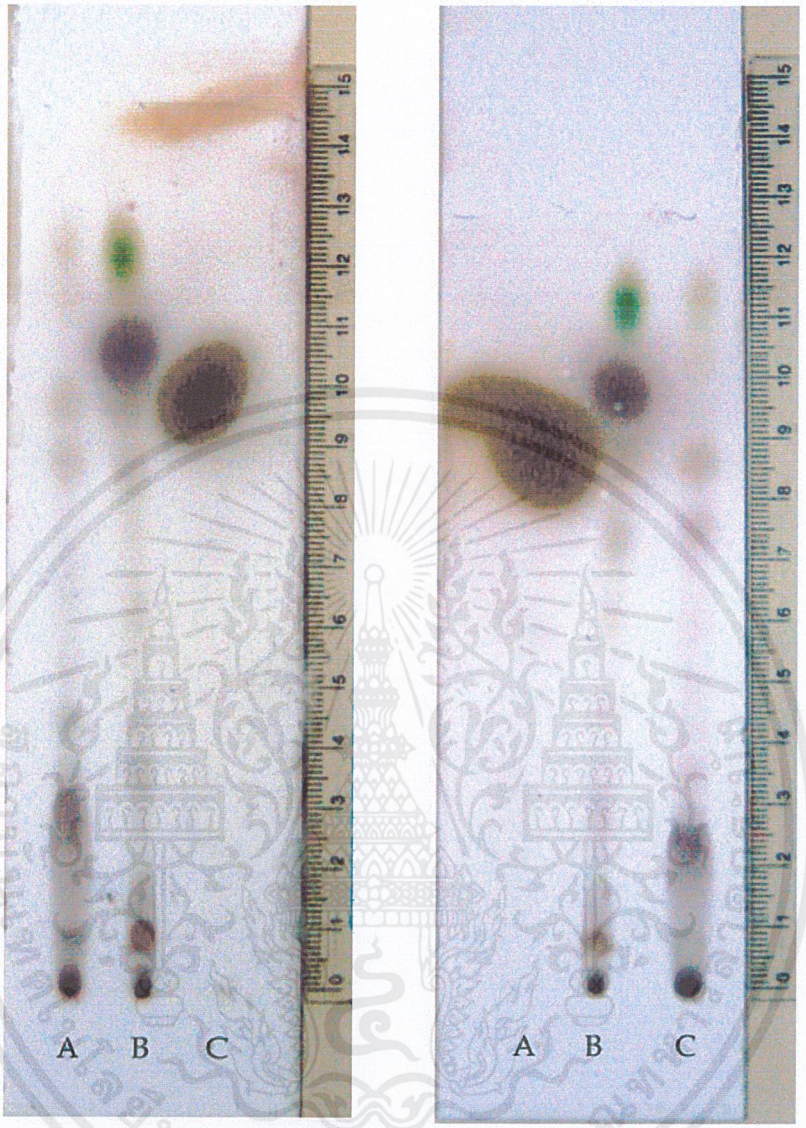
จากรูปเห็นได้ว่าแถบ A ไม่พบแถบของสารสีเขียวหลังจากทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ซึ่งแตกต่างจากแถบ B ที่พบสารสีเขียว รวมทั้งในแถบ A ไม่พบสารสีม่วงเข้ม ในตำแหน่งระยะทางที่ตรงกับสารมาตรฐานยูจีนอลในแถบ C ส่วนแถบ B นั้นพบแถบสารต่าง ๆ หลายตัว และมีแถบที่มีสีม่วงเข้ม ในระยะทางที่ตรงกับสารมาตรฐานยูจีนอลในแถบ C ด้วย

ตารางที่ 5 ค่า R_f จากการคำนวณแถบโครมาโตกราฟีรูปที่ 11

ลำดับ	ค่า R_f แถบ A	ค่า R_f แถบ B	ค่า R_f แถบ C
1	0.846	0.846	0.700
2	0.653	0.733	
3	0.580	0.580	
4	0.300	0.293	
5	0.226	0.226	
6	0.053	0.060	
7	0.000	0.000	

จากตารางที่ 5 ค่า R_f ของแถบโครมาโตกราฟี แสดงให้เห็นว่าในสารสกัดแคลลัสมีสารที่เป็นองค์ประกอบ 7 ชนิด และในสารสกัดจากต้นที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง พบสารที่เป็นองค์ประกอบ 7 ชนิดเช่นกัน เมื่อนำค่า R_f ที่คำนวณได้มาเปรียบเทียบกับค่า R_f ที่คำนวณจากสารละลายมาตรฐานยูจีนอล พบว่า มีค่า R_f ในสารละลายมาตรฐานยูจีนอลมีค่า R_f ใกล้เคียงกับที่คำนวณได้จากสารสกัดจากต้นที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง แต่อย่างไรก็ตามยังไม่อาจบอกได้ว่าเป็นสารเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก. ข.

รูปที่ 12 แถบสารบนโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบาง หลังจากพ่นกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

12 ก. แถบ A สารสกัดจากแคลลัส สูตร 10

แถบ B สารสกัดจากต้น

แถบ C สารละลายมาตรฐานลินาลูออล

12 ข. แถบ A สารละลายมาตรฐานลินาลูออล

แถบ B สารสกัดจากต้น

แถบ C สารสกัดจากแคลลัส สูตร 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 12 แถบ A Bและ C แสดงการเคลื่อนที่ขององค์ประกอบต่าง ๆ ของสารพบว่า แถบ A,B ในรูปที่ 12 ก. และแถบ B,C ในรูปที่ 12 ข.มีองค์ประกอบของสารอยู่หลายประเภท วิเคราะห์โดยใช้คุณสมบัติหลายประการ คือ ความสามารถในการละลายในตัวทำละลาย ซึ่งเป็น mobile phase และการถูกดูดซับโดยซิลิกาเจลซึ่งเป็น stationary phase ได้แตกต่างกันทำให้เราสามารถเห็นแถบสีของสารต่าง ๆ ได้ที่ระยะแตกต่างกันรวมทั้งใช้คุณสมบัติของสารต่าง ๆ ที่สามารถทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริก เข้มข้น แล้วเกิดสีแตกต่างกันด้วย จากรูปที่ 12 ก. เห็นได้ว่า แถบ A ไม่พบแถบของสารสีเขียวหลังจากทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ซึ่งแตกต่างจากแถบ B ที่พบสารสีเขียว รวมทั้งในแถบ A ไม่พบสารสีม่วงน้ำตาล ในตำแหน่งระยะทางที่ตรงกับสารมาตรฐานลินาลูออลในแถบ C ส่วนแถบ B นั้นพบแถบสารต่าง ๆ หลายตัวและมีแถบที่มีสีม่วงน้ำตาล ในระยะทางที่ตรงกับสารมาตรฐานลินาลูออลในแถบ C ด้วย ส่วนในรูปที่ 12 ข. เห็นได้ว่าแถบ C ไม่พบแถบของสารสีเขียวหลังจากทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ซึ่งแตกต่างจากแถบ B ที่พบสารสีเขียว รวมทั้งในแถบ C ไม่พบสารสีม่วงน้ำตาล ในตำแหน่งระยะทางที่ตรงกับสารมาตรฐานลินาลูออลในแถบ C ส่วนแถบ B นั้นพบแถบสารต่าง ๆ หลายตัวและมีแถบที่มีสีม่วงน้ำตาล ในระยะทางที่ตรงกับสารมาตรฐานลินาลูออลในแถบ C ด้วย

ตารางที่ 6 ค่า R_f จากการคำนวณแถบโครมาโตกราฟีรูปที่ 12 ก.

ลำดับ	ค่า R_f แถบ A	ค่า R_f แถบ B	ค่า R_f แถบ C
1	0.842	0.842	0.678
2	0.664	0.726	
3	0.595	0.664	
4	0.308	0.596	
5	0.293	0.308	
6	0.048	0.239	
7	0.000	0.062	
8		0.000	

จากตารางที่ 6 ค่า R_f ของแถบโครมาโตกราฟี แสดงให้เห็นว่าในสารสกัดแคลลัสมีสารที่เป็นองค์ประกอบ 7 ชนิด และในสารสกัดจากต้นที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง พบสารที่เป็นองค์ประกอบ 8 ชนิด เมื่อนำค่า R_f ที่คำนวณได้มาเปรียบเทียบกับค่า R_f ที่คำนวณจากสารละลายมาตรฐานลินาลูออล พบว่า ค่า R_f มีค่าใกล้เคียงกับแถบสารลำดับที่ 2 ของสารสกัดจากแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

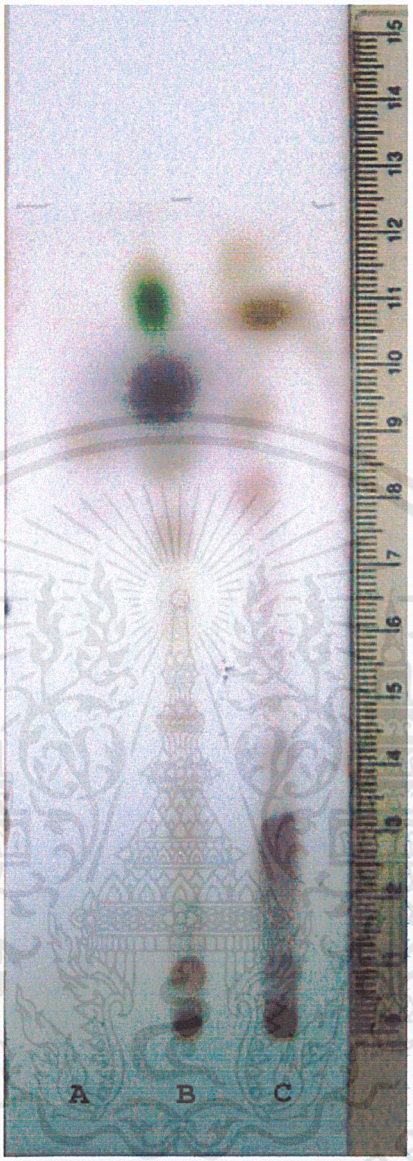
(แถบ A) และลำดับที่ 3 ของสารสกัดจากต้นที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง(แถบ B) แต่ยังไม่อาจบอกได้ว่าเป็นสารเดียวกัน

ตารางที่ 7 ค่า R_f จากการคำนวณแถบโครมาโตกราฟีรูปที่ 12 ข.

ลำดับ	ค่า R_f แถบ A	ค่า R_f แถบ B	ค่า R_f แถบ C
1	0.693	0.889	0.898
2		0.772	0.685
3		0.077	0.591
4		0.583	0.000
5		0.055	
6		0.000	

จากตารางที่ 7 ค่า R_f ของแถบโครมาโตกราฟี แสดงให้เห็นว่าในสารสกัดจากต้นที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง พบสารที่เป็นองค์ประกอบ 6 ชนิด และในสารสกัดแคลลัส มีสารที่เป็นองค์ประกอบ 4 ชนิด เมื่อนำค่า R_f ที่คำนวณได้มาเปรียบเทียบกับค่า R_f ที่คำนวณจากสารละลายมาตรฐานลินาลูออล ไม่พบค่า R_f ที่ใกล้เคียงกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 13 แถบสารบนโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบาง หลังจากพ่นกรดซัลฟิวริกเข้มข้น
แถบ Aสารละลายมาตรฐานไพนีน
แถบ B สารสกัดจากต้นที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง
แถบ C สารสกัดจากแคลลัส

จากรูปที่ 13 แถบ A B และ C แสดงการเคลื่อนที่ขององค์ประกอบต่าง ๆ ของสาร ซึ่งพบว่าแถบ BและC มีองค์ประกอบของสารอยู่หลายประเภท วิเคราะห์โดยใช้คุณสมบัติหลายประการ คือ ความสามารถในการละลายในตัวทำละลาย ซึ่งเป็น mobile phase และการถูกดูดซับโดยซิลิกาเจลซึ่งเป็น stationary phase ได้แตกต่างกันทำให้เราสามารถเห็นแถบสีของสารต่าง ๆ ได้ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะแตกต่างกัน รวมทั้งใช้คุณสมบัติของการที่สารต่าง ๆ สามารถทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกเข้มข้น แล้วเกิดสีแตกต่างกันด้วยจากรูปเห็นได้ว่าแถบ C ไม่พบแถบของสารสีเขียวหลังจากทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ซึ่งแตกต่างจากแถบ B ที่พบสารสีเขียวและแถบ B ยังพบแถบสีม่วงสดที่เด่นชัดด้วย ส่วนแถบ C นั้นพบแถบสีน้ำตาลเข้มเด่นชัด นอกจากนี้ยังพบอีกว่าทั้งแถบ B และ C มีแถบสีน้ำตาลอ่อนที่มีระยะทางการเคลื่อนที่ตรงกับสารมาตรฐานยูจีนอลในแถบ A ด้วย

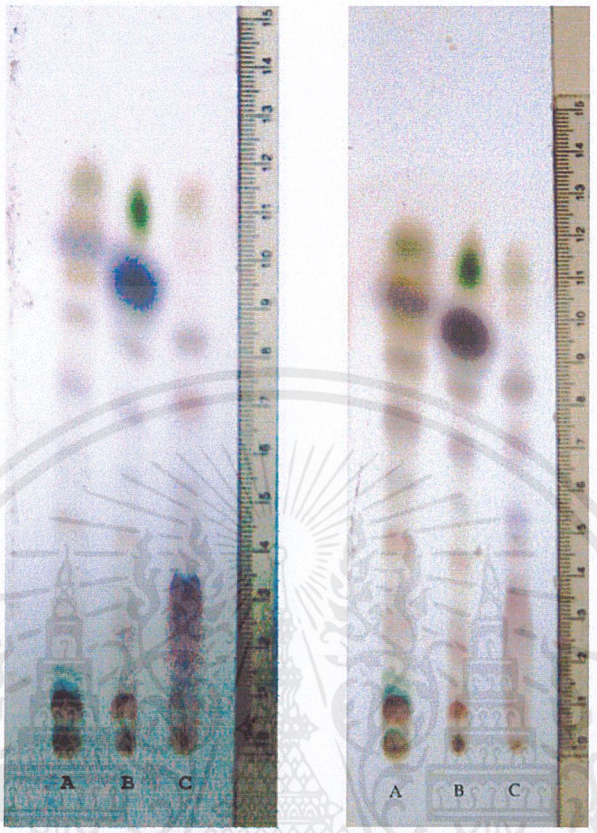
ตารางที่ 8 ค่า R_f จากการคำนวณแถบโครมาโตกราฟีรูปที่ 13

ลำดับ	ค่า R_f แถบ A	ค่า R_f แถบ B	ค่า R_f แถบ C
1	0.709	0.903	0.944
2		0.782	0.871
3		0.702	0.750
4		0.605	0.661
5		0.516	0.339
6		0.379	0.080
7		0.073	0.000
8		0.000	

จากตารางที่ 8 ค่า R_f ของแถบโครมาโตกราฟี แสดงให้เห็นว่าในสารสกัดจากต้นที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง พบสารที่เป็นองค์ประกอบ 8 ชนิด และในสารสกัดแคลลัสมีสารที่เป็นองค์ประกอบ 7 ชนิด เมื่อนำค่า R_f ที่คำนวณได้มาเปรียบเทียบกับค่า R_f ที่คำนวณจากสารละลายมาตรฐานไพนีน พบว่า ค่า R_f ของสารละลายมาตรฐานไพนีน มีค่า R_f ใกล้เคียงกับค่า R_f ของสารลำดับที่ 3 ของสารสกัดจากต้นที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง (แถบ B)

นำสารสกัดที่ได้จากต้นเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ ต้นที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง และแคลลัสจากสูตรที่คัดเลือกมาเปรียบเทียบองค์ประกอบของสารโดยวิธีโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบางดังรูปที่ 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก. ข.

รูปที่ 14 แถบสารบนโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบาง หลังจากพ่นกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

14 ก. แถบ A สารสกัดจากต้นที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ

แถบ B สารสกัดจากต้นที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง

แถบ C สารสกัดจากแคลลัสสูตร 10

14 ข. แถบ A สารสกัดจากต้นแถบที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ

แถบ B สารสกัดจากต้นที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง

แถบ C สารสกัดจากแคลลัสสูตร 16

จากรูปที่ 14 แถบ A B และ C แสดงการเคลื่อนที่ขององค์ประกอบต่าง ๆ ของสาร ซึ่งพบว่าแถบ A B และ C มีองค์ประกอบของสารอยู่หลายประเภท วิเคราะห์โดยใช้คุณสมบัติหลายประการ คือ ความสามารถในการละลายในตัวทำละลาย ซึ่งเป็น mobile phase และการถูกดูดซับโดยซิลิกาเจลซึ่งเป็น stationary phase ได้แตกต่างกันทำให้เราสามารถเห็นแถบสีของสารต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ที่ระยะแตกต่างกัน รวมทั้งใช้คุณสมบัติของการที่สารต่าง ๆ สามารถทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

ตารางที่ 9 ค่า R_f จากการคำนวณแถบโครมาโตกราฟีรูปที่ 14 ก.

ลำดับ	ค่า R_f จากแถบ A	ค่า R_f จากแถบ B	ค่า R_f จากแถบ C
1	0.818	0.769	0.818
2	0.727	0.664	0.580
3	0.615	0.573	0.483
4	0.499	0.476	0.000
5	0.315	0.287	
6	0.056	0.161	
7	0.000	0.056	
8		0.000	

จากตารางที่ 9 ค่า R_f ของแถบโครมาโตกราฟี แสดงให้เห็นว่าในสารสกัดจากต้นที่เพาะเลี้ยงในธรรมชาติ พบสารที่เป็นองค์ประกอบ 7 ชนิด ในสารสกัดจากต้นที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง พบสารที่เป็นองค์ประกอบ 8 ชนิด และในสารสกัดจากแคลลัสสูตร 10 มีสารที่เป็นองค์ประกอบ 4 ชนิด เมื่อนำค่า R_f ที่คำนวณได้มาเปรียบเทียบกัน พบว่า มีสารหลายชนิดที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 10 ค่า R_f จากการคำนวณแถบโครมาโตกราฟีรูปที่ 14 ข.

ลำดับ	ค่า R_f จากแถบ A	ค่า R_f จากแถบ B	ค่า R_f จากแถบ C
1	0.837	0.809	0.809
2	0.751	0.695	0.723
3	0.645	0.596	0.603
4	0.539	0.504	0.504
5	0.447	0.390	0.369
6	0.348	0.312	0.333
7	0.206	0.163	0.064
8	0.071	0.064	0.000
9	0.000	0.000	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 10 ค่า R_f ของแถบโครมาโตกราฟี แสดงให้เห็นว่าในสารสกัดจากต้นที่เพาะเลี้ยงในธรรมชาติ พบสารที่เป็นองค์ประกอบ 9 ชนิด ในสารสกัดจากต้นที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง พบสารที่เป็นองค์ประกอบ 9 ชนิด และในสารสกัดแคลลัสสูร 16 มีสารที่เป็นองค์ประกอบ 8 ชนิด เมื่อนำค่า R_f ที่คำนวณได้มาเปรียบเทียบกัน พบว่า มีสารหลายชนิดที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกัน

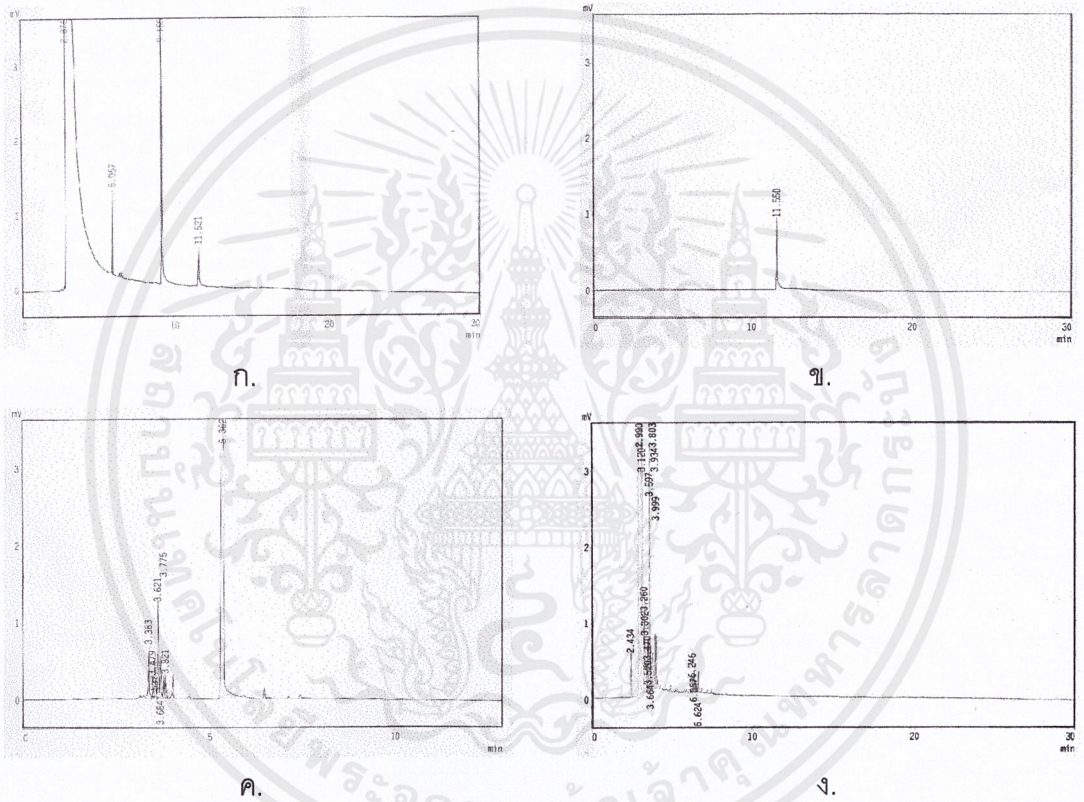
วิจารณ์ผลการทดลอง

จากขั้นตอนการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดอย่างหยาบ โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบาง พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดอย่างหยาบที่ได้หลังการระเหยตัวทำละลายออกไปแล้วของต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ ต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลองและจากแคลลัสมีความเข้มข้นของสารสกัดอย่างหยาบไม่เท่ากัน รวมถึงปริมาณของสารสกัดอย่างหยาบที่ใช้หยดลงบนแผ่นซิลิกาเจล ในแต่ละครั้งไม่เท่ากัน ซึ่งการใช้ความเข้มข้นและปริมาณที่ไม่เท่ากันนั้น ทำให้จุดที่หยดสารปริมาณมากแถบสารที่ได้จะปรากฏเห็นสีอย่างชัดเจน แต่ในจุดที่หยดสารปริมาณน้อยแถบสารจะปรากฏสีจาง ๆ หรือไม่ปรากฏสีเลย ดังนั้นจึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบองค์ประกอบของสารสกัดอย่างหยาบจากกะเพราที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง ในธรรมชาติ และจากแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การวิเคราะห์โดยใช้เครื่องกาซโครมาโตกราฟี(GC)

จากการวิเคราะห์โดยวิธีกาซโครมาโตกราฟีพบว่า สารสกัดอย่างหยาบจากต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง ประกอบด้วยองค์ประกอบทั้งหมด 4 องค์ประกอบซึ่งมีค่าเวลาคงค้าง (retention time; ret. time) ดังแสดงในรูปที่ 15 และตารางที่ 11



รูปที่ 15 เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากกะเพราที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลองกับสารมาตรฐาน

15 ก. โครมาโตแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากกะเพราที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง

15 ข. โครมาโตรแกรมของสารมาตรฐานยูจีนอล

15 ค. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานลินาลูออล

15 ง. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานไพนีน

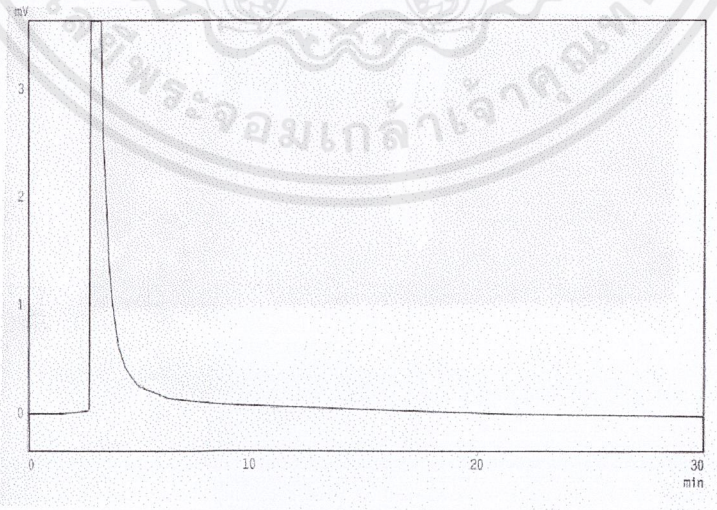
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 ร้อยละขององค์ประกอบในสารสกัดอย่างหยาบจากต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง

Peak NO.	ret. time (min)	ร้อยละ
1	2.863	98.8042
2	5.941	0.0362
3	9.156	1.1257
4	11.503	0.0339

จากโครมาโตแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง ตารางที่ 11 พบว่ามีพีค 4 พีค ซึ่งพีคที่ 1 ในโครมาโตรแกรม คือตัวทำละลายอะซีโตไนไตร์ลที่มีเวลาคงค้างเท่ากับ 2.863 เมื่อนำพีคมาเปรียบเทียบกับโครมาโตรแกรมของสารมาตรฐานยูจีนอล (ค่าเวลาคงค้าง เท่ากับ 11.550) สารมาตรฐานลินาลูออล (ค่าเวลาคงค้าง เท่ากับ 5.862) สารมาตรฐานไพนีน (ค่าเวลาคงค้าง เท่ากับ 3.999) พบว่า ในโครมาโตแกรมของสารสกัดอย่างหยาบมีพีคที่มีค่าใกล้เคียงกับสารมาตรฐานยูจีนอล และลินาลูออล แต่อย่างไรก็ตามยังไม่อาจสรุปได้ว่าเป็นสารตัวเดียวกันกับสารมาตรฐาน

ในการวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัสกะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS สูตร 10 และ 16 ไม่พบน้ำมันหอมระเหย ดังรูปที่ 16

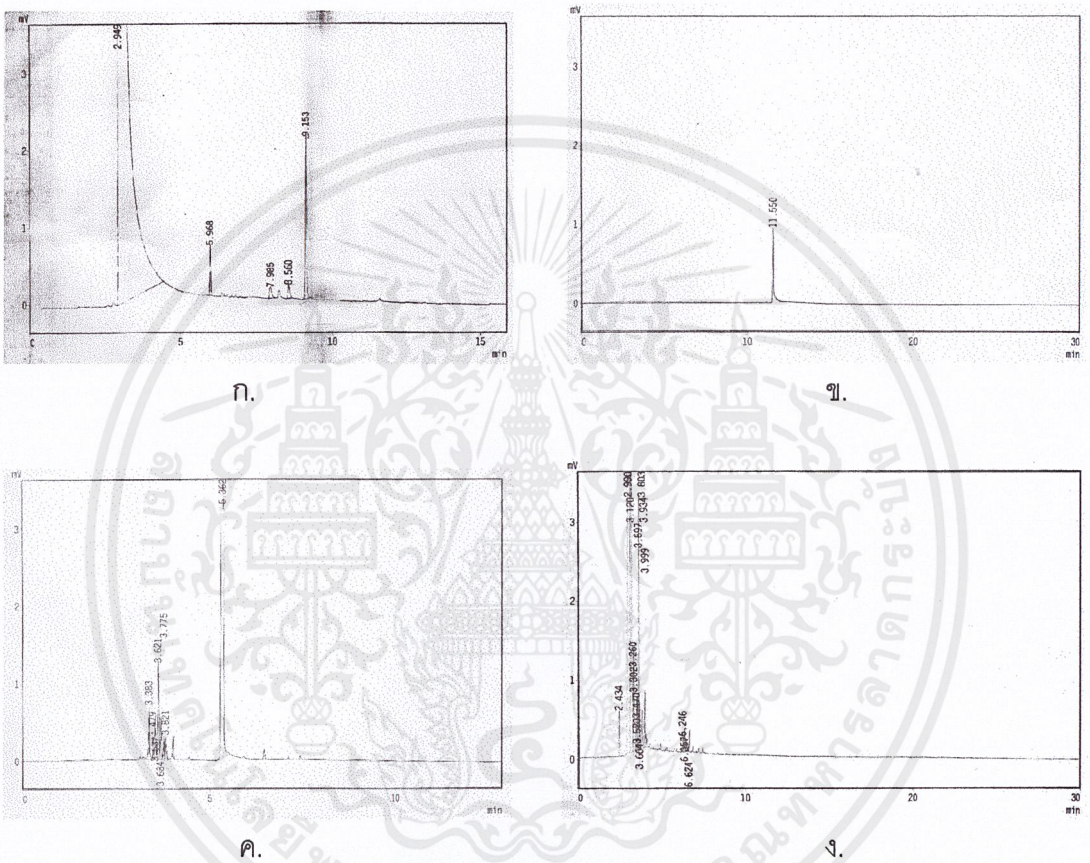


รูปที่ 16 โครมาโตแกรมของสารสกัดอย่างหยาบในแคลลัสกะเพรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากโครมาโตแกรมแสดงให้ทราบว่าในแคลลัสไม่มีน้ำมันหอมระเหย เนื่องจากไม่มีพีคอื่นนอกจากพีคของอะซีโตไนไตร์ล

การวิเคราะห์สารสกัดอย่างหยาบในต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ โดยวิธีกาซโครมาโตกราฟี ผลดังรูปที่ 17



รูปที่ 17 เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากกะเพราที่เพาะเลี้ยงในธรรมชาติกับสารมาตรฐาน

17 ก. โครมาโตแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากกะเพราที่เพาะเลี้ยงในธรรมชาติ

17 ข. โครมาโตรแกรมของสารมาตรฐานยูจีนอล

17 ค. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานลินาลูออล

17 ง. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานไพนีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

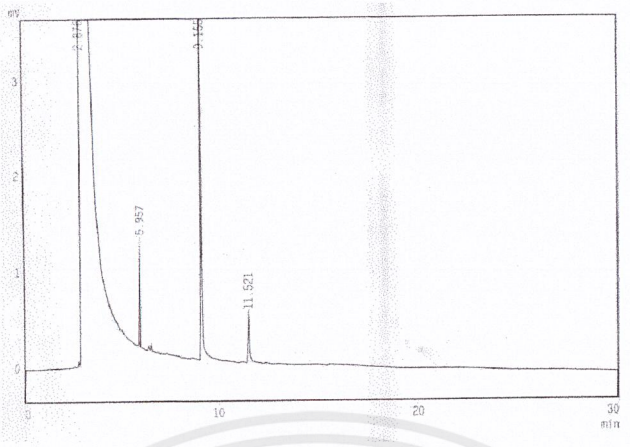
ตารางที่ 12 ร้อยละขององค์ประกอบในสารสกัดอย่างหยาบจากต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงในธรรมชาติ

Peak NO.	ret. Time (min)	ร้อยละ
1	2.949	99.7720
2	5.968	0.0314
3	7.985	0.0204
4	8.560	0.0175
5	9.153	0.1588

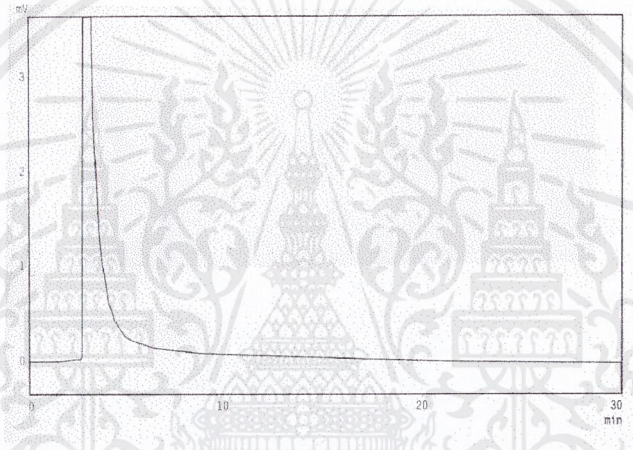
จากโครมาโตแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง ตารางที่ 12 พบว่ามีพีค 5 พีค ซึ่งพีคที่ 1 ในโครมาโตรแกรม คือตัวทำละลายอะซีโตไนไตร์ลที่มีเวลาคงค้างเท่ากับ 2.949 เมื่อนำพีคมาเปรียบเทียบกับโครมาโตรแกรมของสารมาตรฐานยูจีนอล (ค่าเวลาคงค้าง เท่ากับ 11.550) สารมาตรฐานลินาลูออล (ค่าเวลาคงค้าง เท่ากับ 5.862) สารมาตรฐานไพนีน (ค่าเวลาคงค้าง เท่ากับ 3.999) พบว่า ในโครมาโตแกรมของสารสกัดอย่างหยาบมีพีคที่มีค่าใกล้เคียงกับสารมาตรฐานลินาลูออล แต่อย่างไรก็ตามยังไม่อาจสรุปได้ว่าเป็นสารตัวเดียวกันกับสารมาตรฐาน

เมื่อนำโครมาโตรแกรมของสารสกัดอย่างหยาบของต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลองที่เพาะเลี้ยงในธรรมชาติ และแคลลัส มาเปรียบเทียบกันดังรูปที่ 18 พบว่า จากรูปที่ 18 พบว่าในต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง และจากต้นที่เพาะเสี้ยงในธรรมชาติมีพีคใกล้เคียงกัน 2 พีค พีคที่มี ret. time เท่ากับ 5.941 และ 9.153 แต่อย่างไรก็ตามยังไม่อาจสรุปได้ว่าคือสารอะไร

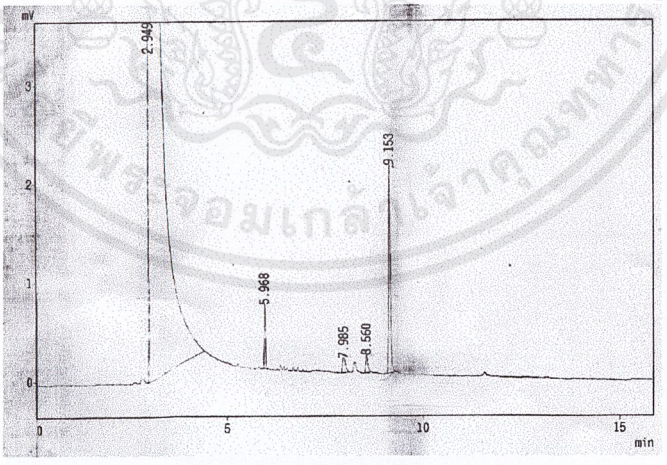
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก.



ข.



ค.

รูปที่ 18 เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากกะเพรา

18 ก. โครมาโตแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากกะเพราที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง

18 ข. โครมาโตรแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัส

18 ค. โครมาโตแกรมของสารสกัดอย่างหยาบกะเพราที่เพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์

การวิเคราะห์สารสกัดอย่างหยาบโดยวิธีกาซโครมาโตกราฟีนั้น ยังไม่สามารถยืนยันได้อย่างแน่ชัดว่า สารที่มีค่า ret.time เดียวกันหรือใกล้เคียงกันนั้น จะเป็นสารตัวเดียวกัน วิธีที่จะพิสูจน์ว่าสารนั้นเป็นตัวเดียวกันหรือไม่ ทำได้โดยนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปกโตมิเตอร์ หรือเครื่องอินฟาเรดสเปกตรา เพื่อให้ทราบสูตรโครงสร้างของสารที่เราศึกษา

จากรูปที่ 16 โครมาโตแกรมของสารสกัดอย่างหยาบจากแคลลัส ไม่ปรากฏพีคน้ำมันหอมระเหยใดๆเลย นอกจากตัวทำละลายอะซิโตไนไตร์ล ซึ่งอาจตั้งข้อสงสัยได้ว่า เนื่องจากแคลลัสเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อเจริญ จึงยังไม่ผลิตน้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยการผลิตน้ำมันหอมระเหยจากเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกะเพรา หลังจากทำตามขั้นตอนการทดลองทั้ง 4 ขั้นแล้ว สามารถสรุปผลการวิจัยได้ว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดกะเพราในขวดทดลอง โดยใช้อาหาร MS และตัดส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของกล้ากะเพราที่เจริญจนมีอายุ 14 วันมาชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสในอาหาร MS ทั้ง 16 สูตร ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ในปริมาณที่แตกต่างกัน พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงกะเพราให้เกิดเป็นแคลลัส คือ สูตร 10 ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1.0 มก./ล. , NAA 0.5 มก./ล. และสูตร 16 ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1.5 มก./ล. , NAA 1.5 มก./ล. ตามลำดับ โดยใช้น้ำหนักของแคลลัส รวมทั้งการพัฒนาไปเป็นต้นและรากของแคลลัสเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกสูตรอาหาร ซึ่งพบว่า แคลลัสที่เจริญในอาหาร MS สูตร 10 นั้นมีขนาดใหญ่ที่สุดและมีการพัฒนาไปเป็นต้นได้ ส่วนแคลลัสที่เจริญในอาหารสูตรที่ 16 นั้น มีขนาดใหญ่ที่สุดเช่นเดียวกันและมีการพัฒนาไปเป็นรากได้ จึงคัดเลือกอาหาร MS สูตรที่ 10 และสูตรที่ 16 ในการชักนำและเพิ่มปริมาณของแคลลัสเพื่อนำไปใช้สกัดสารนำไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป เมื่อนำสารสกัดอย่างหยาบจากพืชกะเพราที่การเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง จากการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติและจากแคลลัสมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบาง พบว่าสารสกัดที่นำมาวิเคราะห์นี้มีองค์ประกอบของสารต่าง ๆ หลายชนิด วิเคราะห์โดยใช้คุณสมบัติหลายประการคือ ความสามารถในการละลายในตัวทำละลาย ซึ่งเป็น mobile phase และการถูกดูดซับโดยซิลิกาเจล ซึ่งเป็น stationary phase ได้แตกต่างกันทำให้สารต่าง ๆสามารถเคลื่อนที่ไปในระยะทางที่แตกต่างกัน และเมื่อทำการพ่นกรดซัลฟิวริกเข้มข้นแล้ว จะปรากฏแถบสีต่าง ๆ ให้เห็นที่ตำแหน่งต่าง ๆ กัน เมื่อนำระยะทางที่สารเคลื่อนที่ไปได้มาคำนวณหาค่า Rf แต่ในขั้นนี้ก็ยังไม่สามารสรุปได้ว่า สารที่สกัดได้นั้นมีองค์ประกอบของสารต่างกัน เนื่องจากในขั้นตอนนี้ใช้ความเข้มข้นสารในการนำมาวิเคราะห์แต่ละครั้งไม่เท่ากัน และในการจุดสารแต่ละชนิดลงบนแผ่นซิลิกาเจลก็ไม่เท่ากันด้วย ทำให้แถบสีที่ปรากฏมีความเข้มต่างกัน ดังนั้นจึงไม่สามารถนำมาใช้ในการยืนยันผลได้ว่าองค์ประกอบที่แยกออกมาได้มีปริมาณสารต่างกัน จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคกาซโครมาโตกราฟีซึ่งเป็นขั้นตอนการวิเคราะห์ที่ให้ผลได้แม่นยำมากกว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบางซึ่งเป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบขั้นต้นเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคกาซโครมาโตกราฟี พบว่าสารสกัดจากต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงโดยในขวดทดลอง และต้นกะเพราที่เพาะปลูกตามธรรมชาติมีพีคต่าง ๆ ในโครมาโตแกรมที่ใกล้เคียงกัน แต่สารสกัดจากแคลลัสเมื่อนำมาวิเคราะห์แล้วไม่พบพีคใด ๆ ในโครมาโตแกรม เมื่อพิจารณาร่วมกับผลการวิเคราะห์โดยโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบางพบองค์ประกอบของสารต่าง ๆ หลายชนิด จึงสรุปได้ว่าในแคลลัสที่เกิดจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงของพืชกะเพรานั้นไม่มีน้ำมันหอมระเหย แต่มีองค์ประกอบของสารชนิดอื่น ๆ อีกหลายประเภท ซึ่งต้องมีการทดลองและวิจัยในขั้นต่อไป ส่วนสารสกัดที่ได้จากต้นที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง และต้นที่เพาะปลูกตามธรรมชาตินั้นมีส่วนประกอบของสารต่าง ๆ ที่ค่อนข้างคล้ายคลึงกันจึงต้องมีการวิจัยโดยใช้เครื่องมือที่วิเคราะห์ได้ละเอียดมากยิ่งขึ้น

งานวิจัยฉบับนี้ จัดทำขึ้นเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงกะเพราในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆของพืชกะเพรา คณะผู้จัดทำหวังว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจบ้างไม่มากก็น้อย

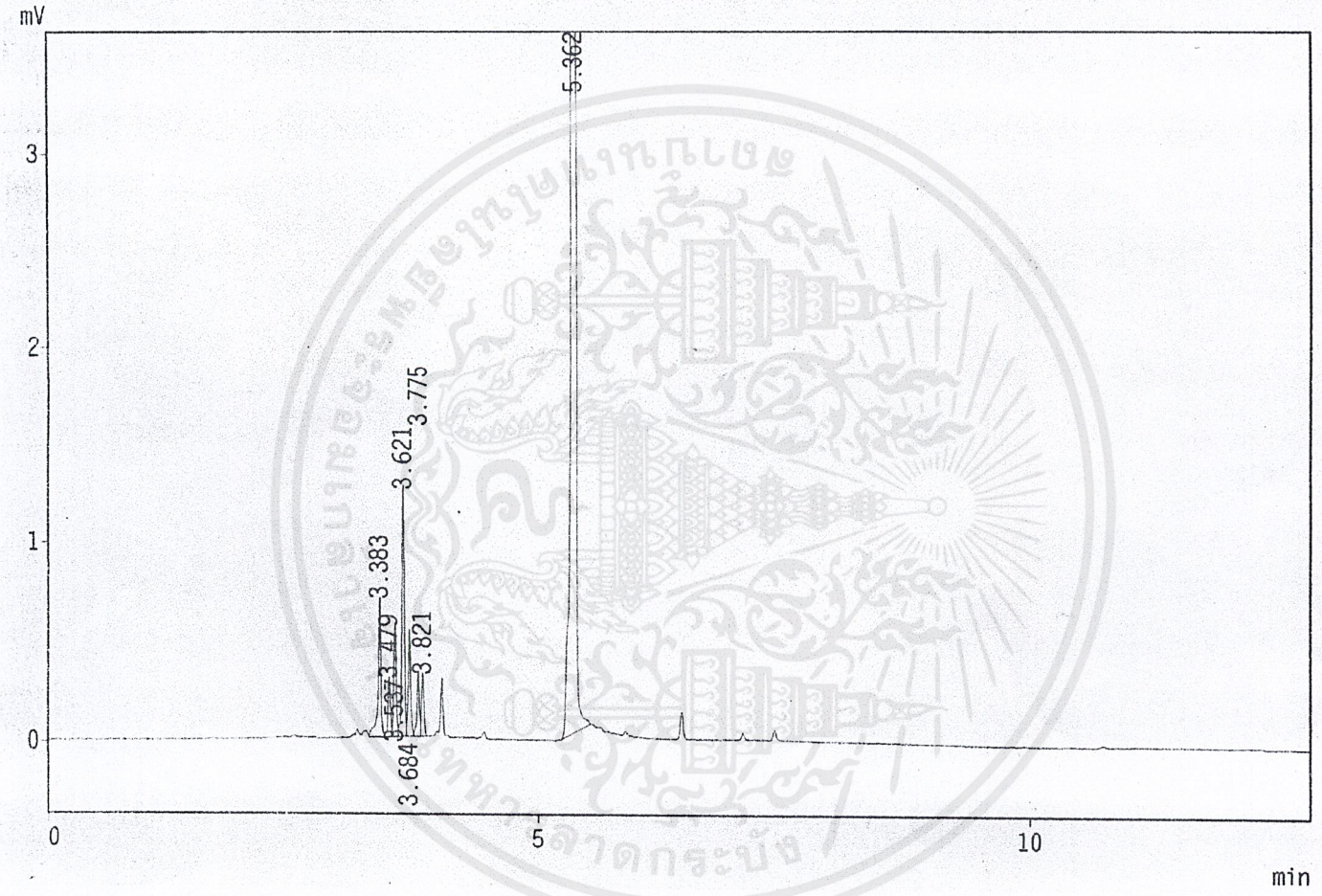
ข้อเสนอแนะ

ควรนำสารสกัดที่ได้จากต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลอง ต้นกะเพราที่ได้จากการเพาะปลูกตามธรรมชาติ และสารสกัดที่ได้จากแคลลัสไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปกโตมิเตอร์และเครื่องอินฟาเรดสเปกตรา เป็นการทดลองควบคู่กันไปด้วย เพื่อเป็นการยืนยันโครงสร้างของสารสกัดต่าง ๆ ที่เราศึกษาให้แน่ชัดด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

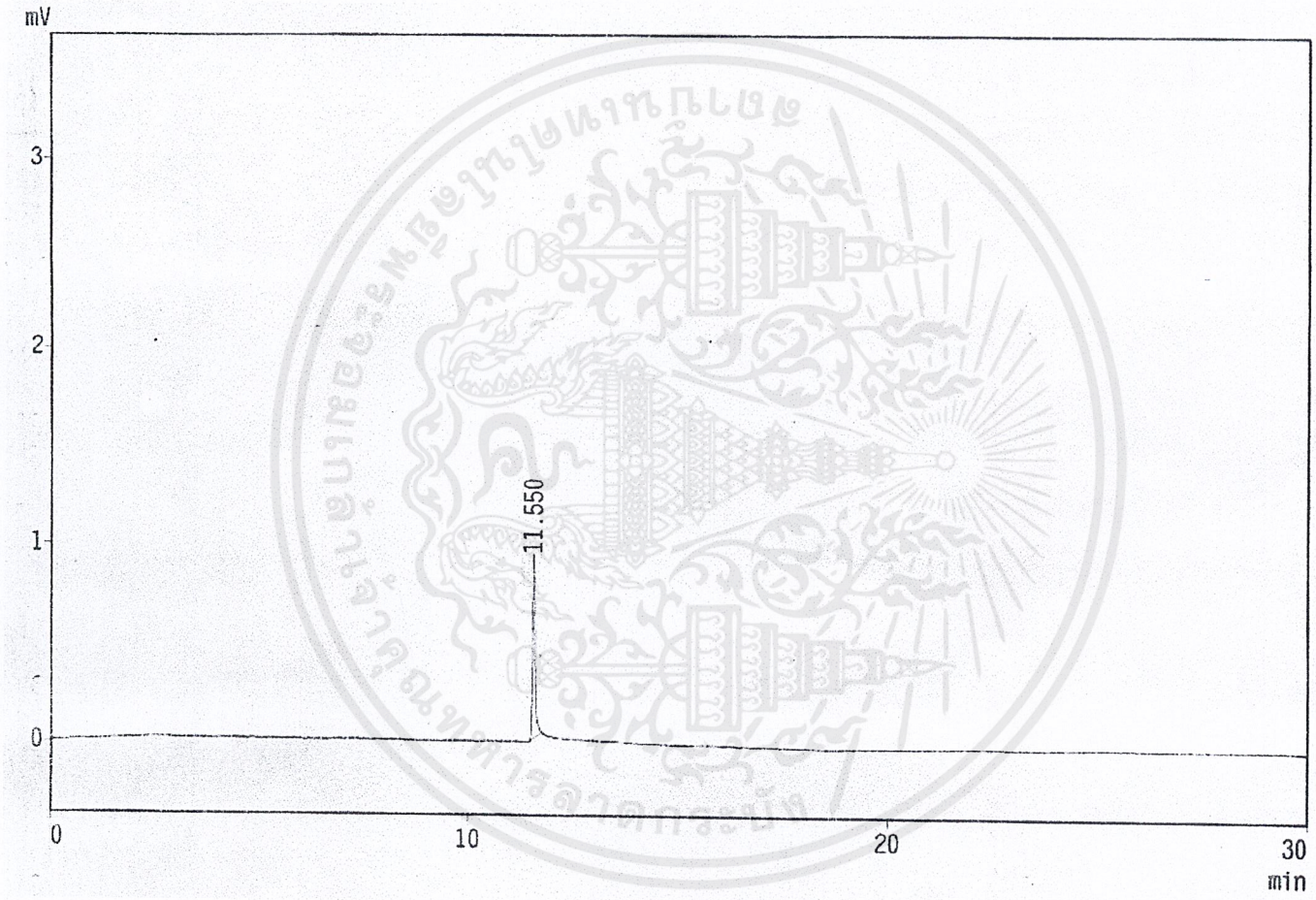
ภาคผนวก ก โครมาโตแกรมจากเครื่องกาซโครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

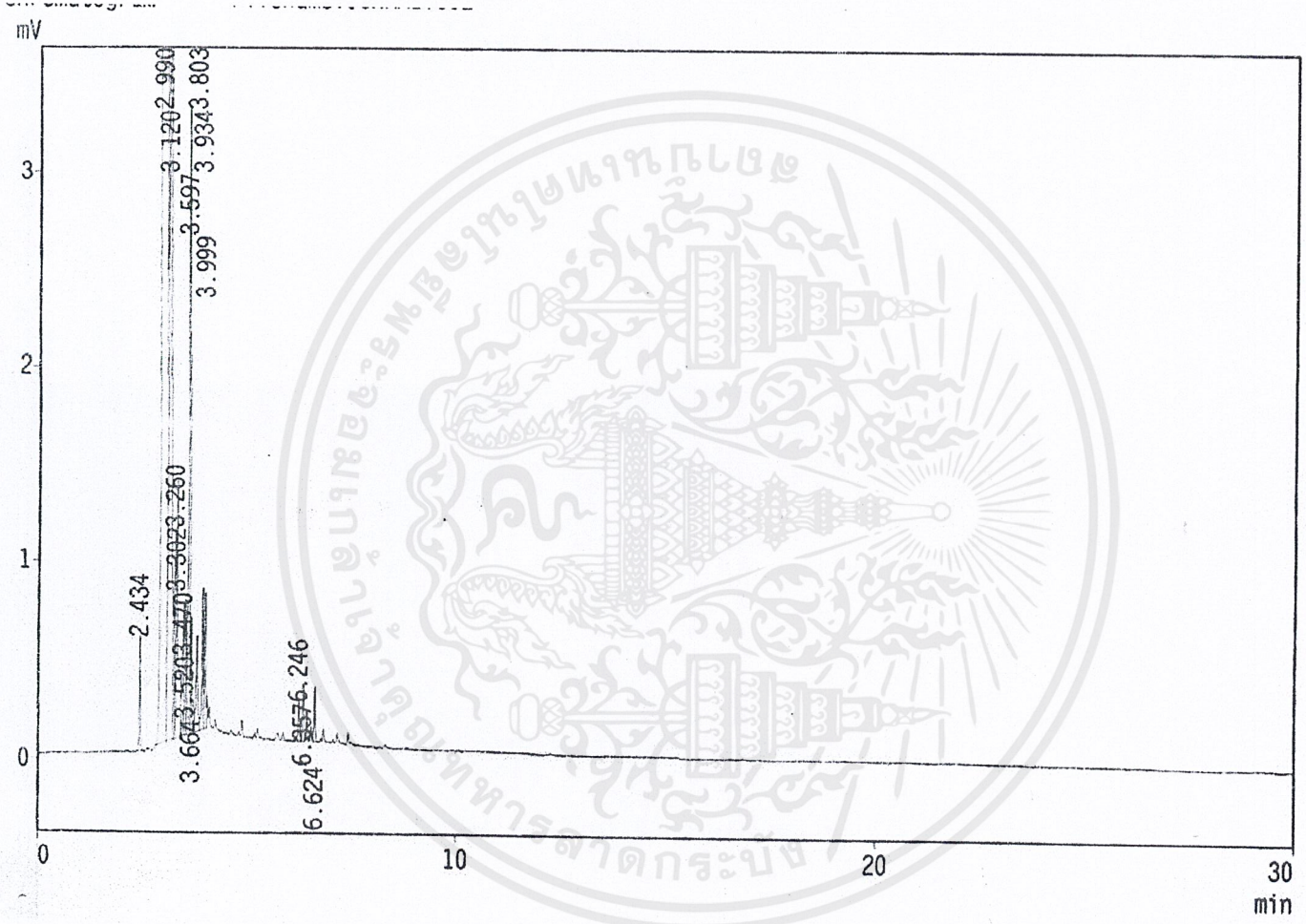


โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานลินาลูออล

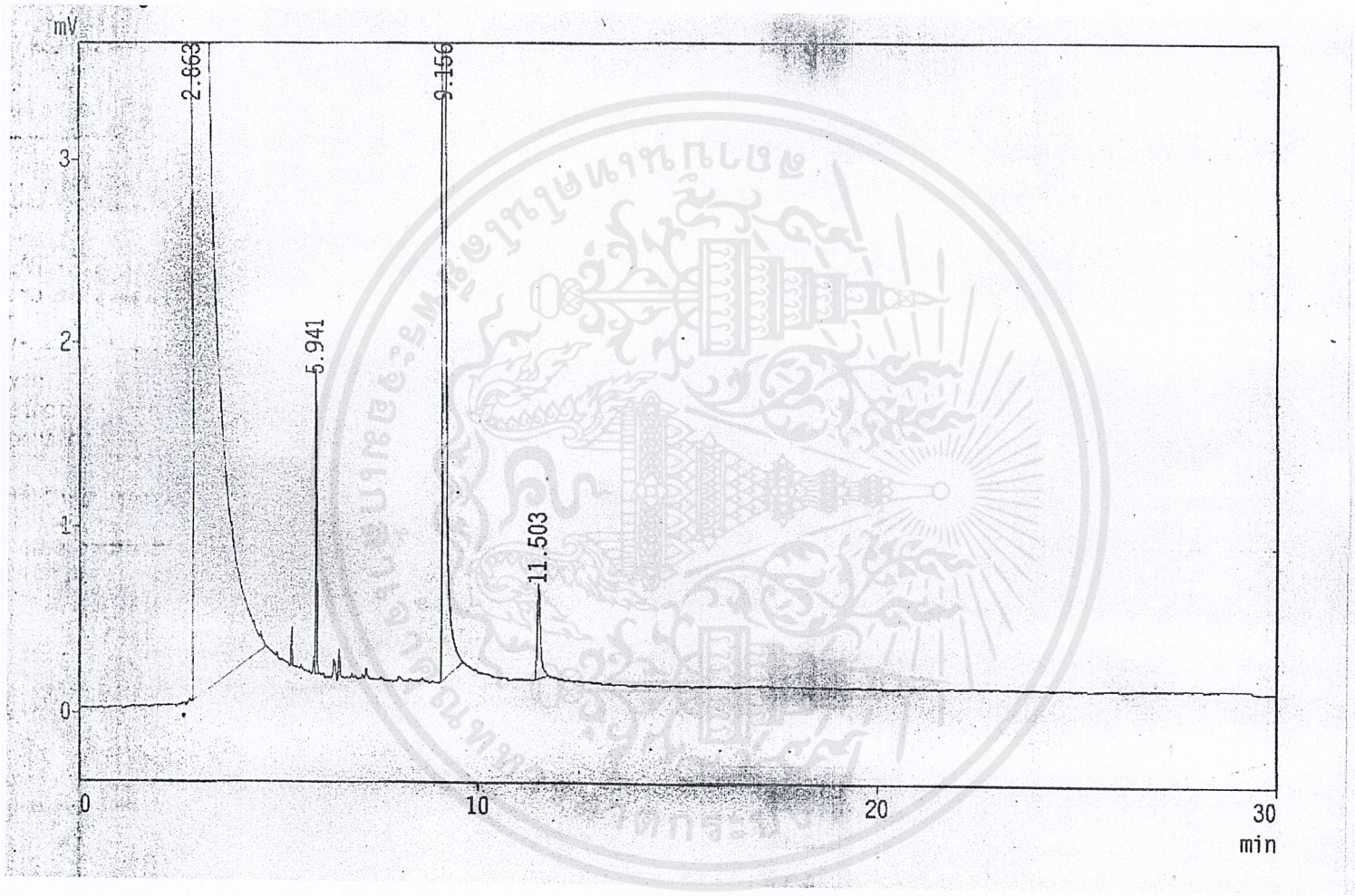
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น



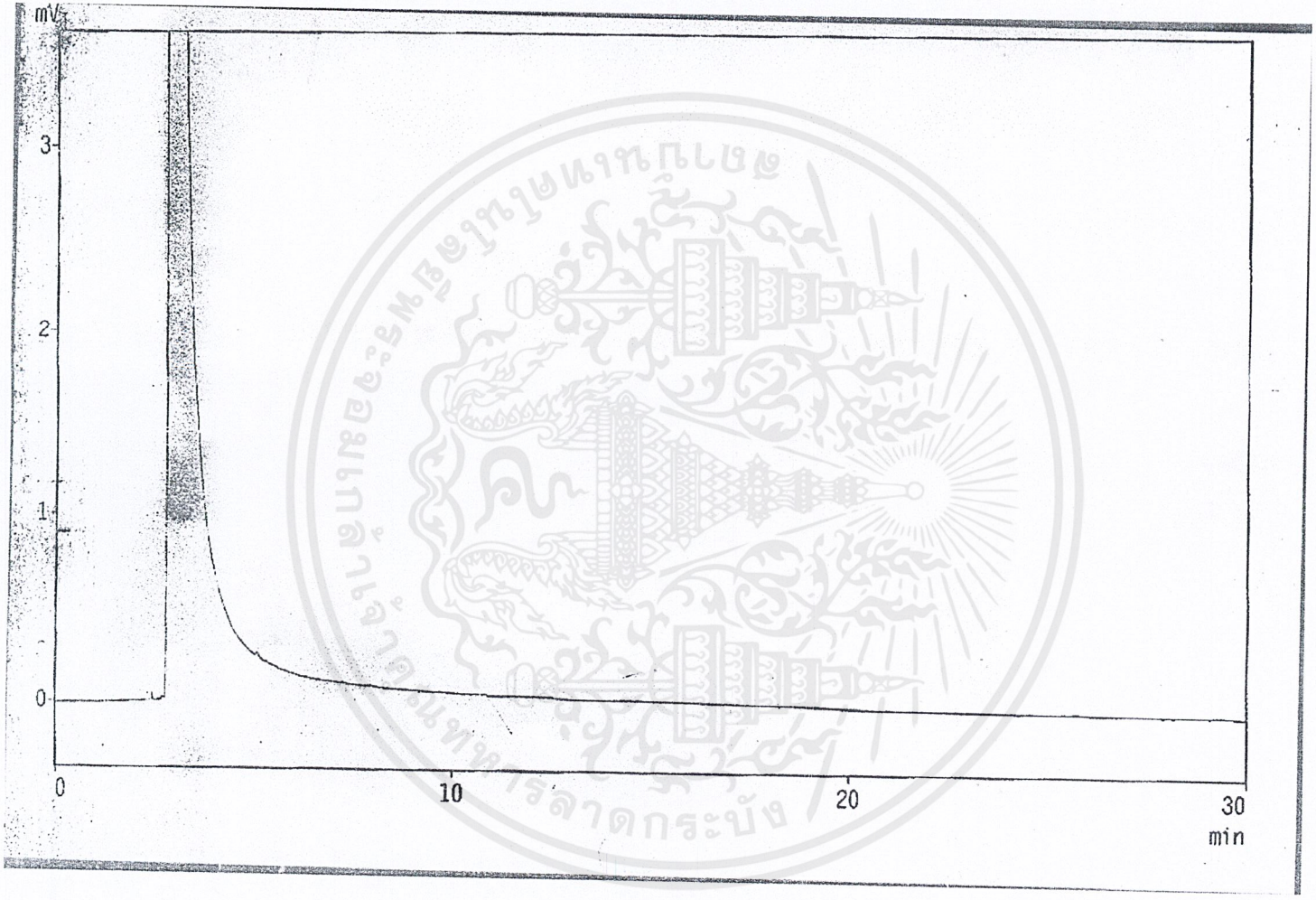
โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานยูจีนอล



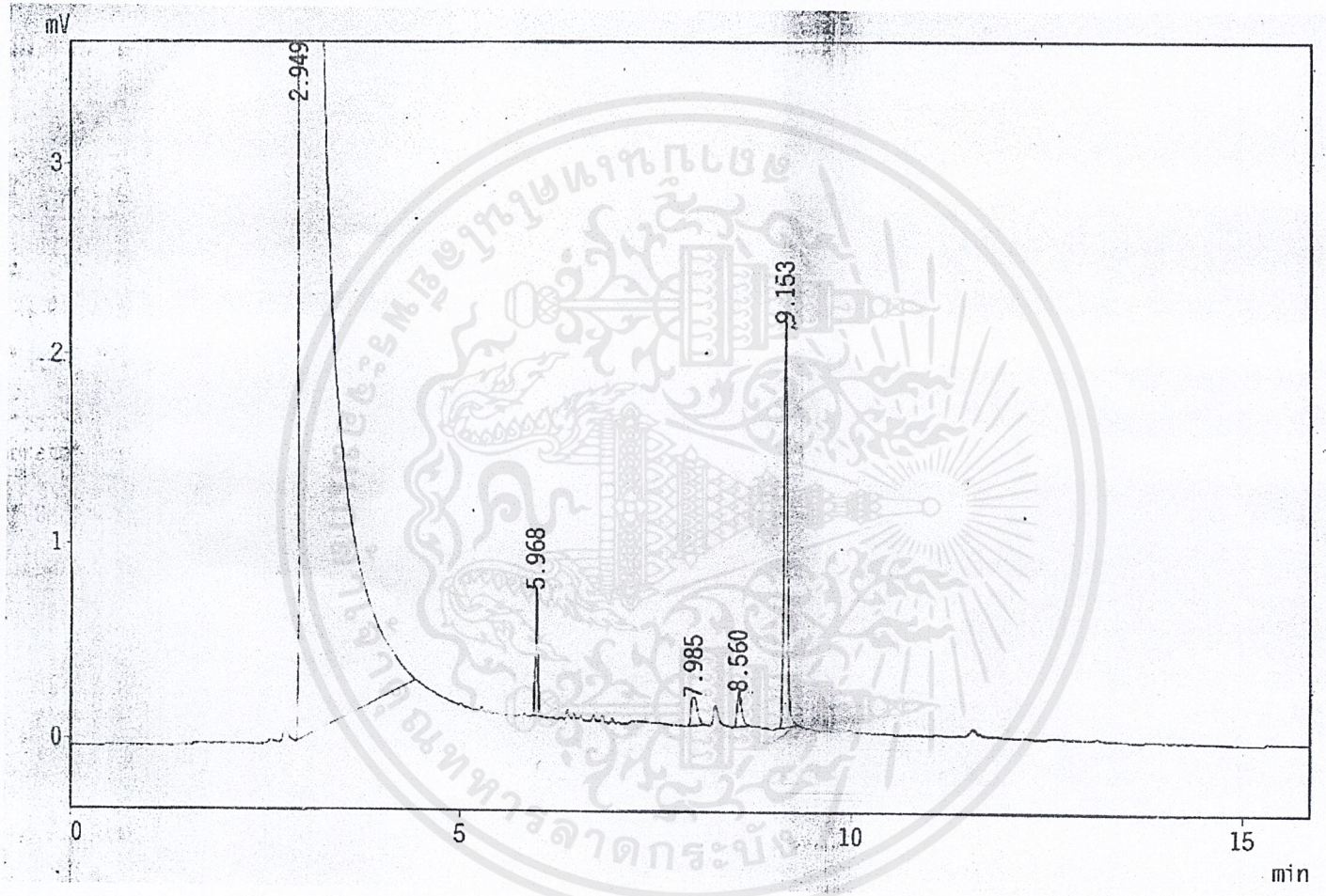
โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานไพนีน



โครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยจากต้นกระเพราที่ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



โครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยจากแคลลัส



โครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยจากต้นกะเพราที่ปลูกตามธรรมชาติ

ภาคผนวก ข การชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารเหลว

เป็นการทดลองนำร่องโดยการนำเอาส่วนของรากจากกล้ากะเพราอายุ 50 วันที่ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีการเติมฮอร์โมน 16 สูตร เหมือนการทดลองข้างต้น ทำไปเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ การให้แสง 700 ลักซ์ 16 ชั่วโมง มืด 8 ชั่วโมง เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ได้ผลการคัดเลือกโดยดูจากการเกิดเป็นแคลลัส ได้สูตร 11 มีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด แสดงการเจริญดังรูป

รูปแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 11 อายุ 50 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา วรวณิชพงศ์ และสุปราณี ศรีโพธิ์ชัย "การศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ไล่แมลง" โครงงานพิเศษ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2538:4-6.

คณิต กฤษณังกูร รศ.ดร. "แก๊สโครมาโตกราฟี" งานเอกสารการพิมพ์ สจธ. กรุงเทพฯ. 2544.

พีระศักดิ์ วรสุนทรโรสถและคณะ ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ลำดับที่ 16 พืชที่ให้น้ำมันหอม สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย(วท.) หน้า 14-47 สำนักพิมพ์สหมิตรพริ้นติ้ง พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ. 2544.

บัญญัติ สุขศรีงาม เครื่องเทศที่เป็นสมุนไพร ภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน 2524.

แม้น อมรสิทธิ์และอมร เพชรสม หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ หน้า 811-860 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิสูตร วัฒนชัยยงค์ "การวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลในน้ำมันหอมระเหยจากพืช" ภาคนิพนธ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน 2525.

Chokechaijaroenporn, O."Studies on chemical contituients and biological effects on mosquitoes(*Aedes aegypti L.*) of volatile oils from *Ocimum spp.* cultivated in Thailand" Master's Thesis, Faculty of graduate studies, Mahidol University, 1991.

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

Nirmal K.,Singh & C.B. Sehgal."Micropropagation of Holy basil (Ocimum sanctum Linn.) from young inflorescences of mature plant" 1999.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้