



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประเมินฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และส่วนประกอบทางเคมีของใบดาวเรือง
Assessment of Antimicrobial Activity and Chemical Composition
of *Tagetes erecta* Linn Leaves

นางสาวพัชณี เจริญยิ่ง

ทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2556
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

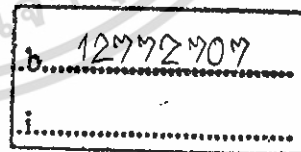
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประเมินฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และส่วนประกอบทางเคมีของใบดาวเรือง
Assessment of Antimicrobial Activity and Chemical Composition
of *Tagetes erecta* Linn Leaves

นางสาวพัชณี เจริญยิ่ง



เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 142205
ง. เลขที่ 27 ไลย. 2559

ทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2556

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การประเมินฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และส่วนประกอบทางเคมีของใบดาวเรือง
แหล่งเงิน งบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปีงบประมาณ 2556 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2555 ถึง กันยายน 2556
หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร. พชณี เจริญยิ่ง
หน่วยงานต้นสังกัด สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เป็นการประเมินการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากส่วนใบของดาวเรือง ใบดาวเรืองแห้งถูกสกัดด้วยเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดหยาบเมทานอลมาละลายด้วยน้ำและสกัดด้วยวิธีแบ่งส่วนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตต และบิวทานอล สารสกัดหยาบทั้งหมดถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และเชื้อรา ด้วยวิธี disc diffusion จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ดี ในขณะที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา เมื่อนำสารสกัดหยาบเฮกเซนมาแยกสารส่วนย่อยด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีสามารถแยกสารส่วนย่อยได้ 6 ส่วนย่อย (H_1-H_6) จากนั้นนำสารส่วนย่อย (H_1-H_6) มาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียพบว่า สารส่วนย่อย H_4 และ H_5 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก โดยมีค่าต่ำสุดในการยับยั้ง (ค่า MIC) ในช่วง 2.5-5.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 5.0-10.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเฮกเซนด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) พบสารประกอบหลักที่สำคัญได้แก่ ethyl linoleolate 39, palmitic acid 40, neophytadiene 41, linoleic acid 42, phytol และ stigmasterol 38 และพบว่า linoleic acid 42 เป็นสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ในระดับที่ดี

คำสำคัญ: ใบดาวเรือง ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

Research Title: Assessment of Antimicrobial Activity and Chemical Composition of *Tagetes erecta* Linn Leaves
Researcher: Asst. Prof. Dr. Patchanee Charoenying
Faculty: Faculty of Science Department: Department of Chemistry

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate antimicrobial activity of extracts from *Tagetes erecta* Linn leaves. The air-dried leaves of *T. erecta* were extracted with methanol. The residue was redissolved in water which was then subjected to solvent-solvent partition with four organic solvents: hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol. Each of these extracts was tested for their antimicrobial activity against gram positive and gram negative bacteria and yeast strains by disc diffusion method. The results found that the hexane extract revealed antimicrobial activity against gram positive and gram negative bacteria while no antifungal activity observed against tested strains of yeasts. Thus, the hexane fraction was fractionated by chromatography technique to obtain 6 fractions (H₁ to H₆). Each fraction was tested for their antimicrobial activity against bacteria strains. The results indicated that fractions F₄ and F₅ exhibited the greatest activity among the fractions. The minimal inhibitory concentrations (MIC values) of selected bacterial strains tested ranged from 2.5-10 mg/mL and 5-10 mg/mL. The composition of the hexane extract was investigated by GC/MS systems. The main components of the hexane extract were ethyl linoleoate 39, palmitic acid 40, neophytadiene 41, linoleic acid 42, phytol 43 and stigmasterol 38. Linoleic acid 42 showed strong activity against gram positive *Staphylococcus aureus* bacteria.

Keywords: *Tagetes erecta* Linn Leaves Antimicrobial

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งในวิทยานิพนธ์ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตของ
คุณรัฐตะวัน พูลรัมย์ และสามารถสำเร็จลุล่วงตามความตั้งใจในระดับหนึ่งด้วยการสนับสนุนเงินทุนวิจัย
จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประเภททุนรายได้คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปีงบประมาณ 2556 ที่พิจารณาเห็นคุณค่าของงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย คุณรัฐตะวัน พูลรัมย์ ที่ตั้งใจและอดทนต่อการทำงานนี้ให้สำเร็จลุล่วงไป
ได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นันทนา อรุณฤกษ์ สาขาโชนวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

ขอขอบคุณ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร
ลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่เอื้อเฟื้อความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยนี้

พัชนี เจริญยิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

| | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย | I |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | II |
| กิตติกรรมประกาศ | III |
| สารบัญ | IV |
| สารบัญตาราง | VI |
| สารบัญภาพ | VII |
| รายการคำย่อและสัญลักษณ์ | VIII |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย | 2 |
| 1.3 ขอบเขตของการวิจัย | 2 |
| 1.4 วิธีดำเนินการวิจัย | 2 |
| 1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย | 3 |
| 1.6 คำสำคัญของการวิจัย | 3 |
| 1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 3 |
| บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 4 |
| 2.1 สารสำคัญในพืชสมุนไพร | 4 |
| 2.2 สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ | 10 |
| 2.3 ดาวเรือง | 10 |
| 2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 12 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย | 17 |
| 3.1 แหล่งของพืชที่ใช้ในการทดลอง | 17 |
| 3.2 สภาวะที่ใช้ในการทดลอง | 17 |
| 3.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน | 17 |
| 3.4 การเตรียมสารสกัดหยาบเมทานอล | 18 |
| 3.5 การแยกสารสกัดหยาบโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี | 18 |
| 3.6 การเตรียมคอลัมน์และการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี | 19 |
| 3.7 การแยกสารส่วนย่อยจากชั้นสารสกัดหยาบโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี | 19 |
| 3.8 การหาค่าประกอบทางเคมีของดอกดาวเรือง | 20 |
| 3.9 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method | 20 |

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|---|----------|
| บทที่ 4 ผลการวิจัย | 25 |
| 4.1 การเตรียมสารสกัดหยาดดอกดาวเรือง | 25 |
| 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาดจากใบดาวเรือง | 25 |
| 4.3 ผลการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาดเฮกเซน | 30 |
| 4.4 ผลการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารส่วนย่อย H_4 และ H_5 จากสารสกัดหยาดเฮกเซน | 32 |
| 4.5 ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบดาวเรือง | 35 |
| 4.6 ผลการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารบริสุทธิ์จากใบดาวเรือง | 40 |
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ | 42 |
| 5.1 สรุปผลการวิจัย | 42 |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ | 44 |
| บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย บรรณานุกรม | 45 48 |
| ประวัตินักวิจัย | 50 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|--|------|
| 3.1 สภาวะของ GC-MS ที่ใช้ในการทดลอง | 20 |
| 4.1 น้ำหนักของสารสกัดหยาบและผลได้เป็นร้อยละ | 25 |
| 4.2 Zones of inhibition ของสารสกัดหยาบจากใบดาวเรือง | 26 |
| 4.3 Zones of inhibition ของสารสกัดหยาบจากใบดาวเรือง | 28 |
| 4.4 การแยกสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบดาวเรือง | 30 |
| 4.5 Zones of inhibition ของสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบเฮกเซน | 31 |
| 4.6 ค่า MIC ของสารสกัดหยาบเฮกเซนและสารส่วนย่อย H ₄ และ H ₅ | 32 |
| 4.7 Zones of inhibition ของสารส่วนย่อย H ₄ | 33 |
| 4.8 Zones of inhibition ของสารส่วนย่อย H ₅ | 34 |
| 4.9 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทเมตรี ของสารสกัดหยาบเฮกเซน | 36 |
| 4.10 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทเมตรี ของสารส่วนย่อย H ₄ และ H ₅ | 38 |
| 4.11 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทเมตรี ของสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน | 39 |

สารบัญญภาพ

| ภาพที่ | หน้า |
|--|------|
| 2.1 ดอกดาวเรือง | 10 |
| 2.2 <i>C. arvensis</i> L. (GWM) และ <i>C. officinalis</i> L. (CM) | 13 |
| 3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดด้วยวิธี Solvent Partitioning Extraction | 23 |
| 3.2 ตัวอย่างของบริเวณของการยับยั้ง (Zone of inhibition) | 24 |
| 3.3 วิธีการวัด Zone of inhibition | 24 |
| 4.1 Zones of inhibition ของสารสกัดจากใบดาวเรือง | 29 |
| 4.2 Zones of inhibition ของสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบเฮกเซน (H ₁ -H ₆) | 31 |
| 4.3 Zone of inhibition ของสารส่วนย่อย H ₄ F ₁ - H ₄ F ₇ | 33 |
| 4.4 Zones of inhibition ของสารส่วนย่อย H ₅ F ₁ - H ₅ F ₅ | 34 |
| 4.5 Zones of inhibition ของ Stigmasterol 38 และ Linoleic acid 42 | 41 |



รายการคำย่อและสัญลักษณ์

| | |
|---------------------|---|
| ^{13}C NMR | ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy |
| DCM | Dichloromethane |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| ^1H NMR | ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy |
| MIC | Minimum Inhibition Concentration |
| R _f | Retardation factor |



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันโลกมีการเปลี่ยนแปลงทางเทคโนโลยีที่ทันสมัยมากขึ้น ทั้งทางด้านการศึกษาค้นคว้า การวิจัย ทางด้านระบบสารสนเทศคอมพิวเตอร์ การผลิตเครื่องอุปโภค บริโภคหรือการแพทย์ การใช้เครื่องมือที่ทันสมัยและรวดเร็วกว่าในอดีต จึงส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงวัฒนธรรมและการดำรงชีวิตของ ผู้คนและส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม รวมทั้งวงจรชีวิตของสิ่งมีชีวิต ทำให้สิ่งมีชีวิตมีจำนวนลดลงเป็น อย่างมาก มนุษย์จึงให้ความสนใจสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพิ่มมากขึ้น จากการใช้สมุนไพรตั้งแต่อดีตซึ่ง เป็นภูมิปัญญาชาวบ้านในท้องถิ่นนั้นมากยิ่งขึ้น โดยสังเกตได้จากการแพทย์แผนโบราณที่ได้รับความนิยม สูง เช่น การนวดประคบด้วยสมุนไพร และสมุนไพรบำบัด เป็นต้น มนุษย์ได้รู้จักการนำพืชมาใช้ เป็นยาตั้งแต่สมัยโบราณ เดิมนำมาใช้ในรูปของพืชสด พืชแห้ง ต่อมาจึงพัฒนายาเตรียมง่าย (galenical preparation) ชนิดต่างๆขึ้น การให้ความสนใจในการศึกษาวิจัยพัฒนาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในชีวิตประจำวันเริ่มมีมากขึ้นตามลำดับเช่นการนำมาทำเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง โดยเน้นในเรื่องการชะลอความแก่ ลดรอยเหี่ยวย่น การนำสมุนไพรเป็นองค์ประกอบหนึ่งเป็นยารักษา โรคของมนุษย์และสัตว์ เป็นอาหารเสริมบำรุงร่างกายคลายความเครียด วิวัฒนาการของการใช้สมุนไพร ได้มีวิวัฒนาการเพื่อให้มีรูปแบบนำใช้และให้ผลการรักษาแน่นอน นักวิจัยจึงได้มีการสกัดสารสำคัญใน การออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามาใช้เป็นยาในรูปสารบริสุทธิ์ เช่นการแยกสารแซนทีน จัดอยู่ในกลุ่มพวก แอลคาลอยด์ สามารถแสดงฤทธิ์กระตุ้นสมองส่วนบน หรือ β -Sitosterol สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใน กลุ่มสเตียรอยด์ที่ใช้เป็นยาเกี่ยวกับหลอดเลือด เป็นต้น

จากเหตุผลที่ดาวเรืองเป็นพืชที่ปลูกได้ง่ายทั่วไป สามารถควบคุมการผลิตได้ และมีอยู่ แพร่หลายในประเทศไทย ผู้วิจัยขอเสนอโครงการวิจัยการประเมินศักยภาพการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของดาวเรือง (*Tagetes erecta* Linn.) โดยศึกษาเฉพาะส่วนใบ ดาวเรืองอยู่ในวงศ์ Asteraceae มีชื่อ สามัญคือ African marigold เป็นต้นไม้พื้นบ้านซึ่งคนไทยคุ้นเคยกันดีโดยเฉพาะส่วนดอก นิยมนำมา ปลูกประดับสถานที่ ประโยชน์และสรรพคุณทางยาของดาวเรืองได้แก่ ใบ ใช้เป็นยาเย็น ทาแผลเน่า เปื่อย ผิวด่างชนิดต่างๆ น้ำคั้นจากใบใช้หยอด แก่เจ็บหู ดอก แก่ริดสีดวงทวาร เป็นยาฟอกเลือด ขับลม ละลายเสมหะ ไอ หลอดลมอักเสบ ปรงกับดั่งไก่เป็นยาบำรุงสายตา ดอกแห้งบดเป็นผงผสมกับอาหาร ไก่ ช่วยให้ไข่แดงสีเข้มขึ้น จากการสืบค้นงานวิจัยที่เกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของดาวเรืองพบว่ามีรายงาน ถึงศักยภาพด้านอัลลีโลพาตีของสารสกัดจากส่วนใบ โดยมีรายงานสารสกัดขึ้นมาจากออลของใบ ดาวเรืองให้ผลดีต่อการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของผักโขมจีน เมื่อเปรียบเทียบกับปลูกใน สารสกัดจากส่วนดอกและเมล็ด และสารสกัดหยาบจากใบดาวเรืองที่มีคุณสมบัติเป็นกรดและกลาง ให้ ผลดีต่อการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของผักโขมจีน [1] สำหรับงานวิจัยในด้านการต้าน เชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากใบดาวเรืองยังไม่มีพบรายงานการวิจัย แต่จาก การทดสอบเบื้องต้นพบว่าสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของใบดาวเรืองมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ใน ช่องปากได้มากกว่า 10 ชนิด จึงเป็นมูลเหตุจูงใจให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะทำการวิจัยฤทธิ์ทาง ชีวภาพของดาวเรืองทางเภสัชวิทยา ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลใหม่ในการนำสารธรรมชาติในการต้าน เชื้อจุลินทรีย์และสามารถนำไปพัฒนาให้ใช้ได้จริงตามที่ตั้งสมมุติฐานไว้ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาศักยภาพการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบดาวเรือง
2. เพื่อแยกสารธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบดาวเรือง
3. เพื่อวิเคราะห์ชนิดและโครงสร้างของสารธรรมชาติที่มีศักยภาพสูงในการต้านเชื้อจุลินทรีย์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. การสกัดแยกสารจากใบดาวเรืองที่มีศักยภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ใช้วิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน โดยเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์
2. สกัดและแยกสารธรรมชาติที่มีศักยภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์
3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ สารสกัดหยาบส่วนย่อย และสารธรรมชาติในรูปของสารบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ
4. การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ ทางเคมีและโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ในแต่ละการทดสอบโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

โครงการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน กล่าวโดยสรุปดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมสารสกัดหยาบด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วนโดยเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์ (Solvent Partition Extraction)

พืชที่ใช้ในการทดลองคือส่วนใบของดาวเรือง ที่มีระยะเวลาการปลูก 45 วัน จากแปลงเกษตรสาขาวิชาผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยคัดเลือกใบที่มีความสมบูรณ์แข็งแรง ไม่มีโรคและแมลงรบกวน และเป็นใบที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ทำความสะอาดใบพืชตัวอย่างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งลมให้แห้งในที่ร่ม และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า และนำมาสกัดด้วยวิธีการหมักด้วยเมทานอล กรองสารละลาย และระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจะได้สารสกัดหยาบเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดเมทานอลมาแยกกลุ่มสารด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วนโดยเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตต และบิวทานอล ตามลำดับ

ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง

การทดลองที่ 1 สารสกัดหยาบที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 1 ถูกส่งไปทดสอบทางเภสัชวินิจฉัย สาขาโษษุวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และหน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยทำการทดสอบแบบ Disc Diffusion Method กับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ และเชื้อรา พิจารณาจาก zone of inhibition และค่า MIC

การทดลองที่ 2 การแยกสารส่วนย่อยและการทดสอบฤทธิ์ของสารส่วนย่อย โดยนำสารสกัดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 มาทำการทดสอบเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารโดยใช้วิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมจึงทำการแยกสารออกฤทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยวิธีคอสมีโครมาโทกราฟี จากนั้นนำสารส่วนย่อยที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 3 การแยกสารบริสุทธิ์และการทดสอบฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ โดยนำสารส่วนย่อยที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดจากการทดลองที่ 2 มาดำเนินการแยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย

นักวิจัยและเภสัชกรได้ให้ความสนใจต่อพืชสมุนไพรชนิดใหม่ที่คาดว่าจะผลิตสารในกลุ่มที่แตกต่างจากเดิม และทำการสกัดสารชีวภาพจากพืชสมุนไพรธรรมชาติพร้อมกับการพัฒนาโครงสร้างของสารชีวภาพโดยมุ่งเน้นถึงการออกฤทธิ์ที่ดีขึ้นในการยับยั้งเชื้อโรคชนิดต่างๆ ทั้งนี้เพื่อลดปริมาณการใช้ยาต้านโรคซึ่งมักอยู่ในรูปของสารสังเคราะห์และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคโดยพืชและโกลด์ซิดธรรมชาติมากที่สุด มีรายงานถึงพืชสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการต้านเชื้อจุลินทรีย์ไว้หลายชนิด [2] การศึกษาหาสารชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ เริ่มจากการนำสารสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารสกัดด้วยเอทานอลของต้นและใบสีฟันคนทาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Plasmodium falciparum* อันเป็นสาเหตุของโรคมalariaเรื้อ [3] สารสกัดจากใบและกิ่งของประยงค์ด้วยเมทานอลพบสารใหม่ (-)-Odorinol ซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในเมล็ดเลือดขาว [4] สารสกัดด้วยปิโตรเลียม อีเทอร์ของพริกไทย (*Piper nigrum*) พบว่าสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ และเมื่อทำการแยกสารบริสุทธิ์พบว่า สารบริสุทธิ์เหล่านั้นสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ดี [5] สารสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ของ *Dunbaria bella* Prain พืชสมุนไพรไทยที่พบในภาคอีสานสามารถออกฤทธิ์ต้านไวรัส HSV types 1 และ 2 ได้ดี [6] จากข้อมูลเหล่านี้ทำให้ทราบถึงศักยภาพของสารสำคัญที่มีอยู่ในพืชในแต่ละชนิดและเป็นแนวทางในการนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคหรือนำไปใช้โดยตรง

1.6 คำสำคัญของการวิจัย

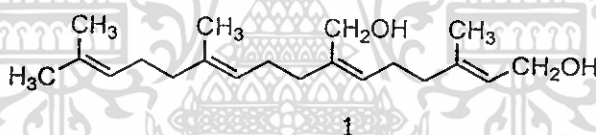
ใบดาวเรือง ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ *Tagetes erecta* Linn. antimicrobial

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสกัดแยกสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์จากใบดาวเรือง
2. ทราบถึงสารธรรมชาติเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์สารที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์
3. ได้นักวิจัยรุ่นใหม่ที่มีความรู้ความสามารถ
4. ได้ข้อมูลทางวิชาการที่สามารถตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารและการประชุมวิชาการต่างๆ

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural product) หมายถึง สารเคมีซึ่งเป็นสารอินทรีย์จากสิ่งมีชีวิต ทั้งพืชและสัตว์ รวมทั้งสมุนไพร สารเคมีดังกล่าวสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรค สิวผสมอาหาร สีย้อมผ้า น้ำมันหอมระเหย และอาหาร เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน วิตามิน เป็นต้น ตลอดจนผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ผลิตภัณฑ์บำรุงสุขภาพและเครื่องสำอาง [7] โดยมีความสำคัญต่อชีวิตประจำวันของมนุษย์เป็นอย่างมาก ทำให้นักเคมีหรือนักวิทยาศาสตร์สาขาอื่นๆ สนใจที่จะศึกษาหาแนวทางในการสกัดสารต่างๆ จากธรรมชาติโดยเฉพาะสมุนไพร เพื่อค้นหาผลิตภัณฑ์ที่ให้ผลทางชีวภาพ (Biologically active substances) ที่สามารถนำมาใช้ให้เป็นประโยชน์ได้ โดยนักเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural product chemist) พยายามสกัดและแยกสารอินทรีย์ต่างๆ ออกมาโดยใช้เทคนิคทางวิทยาศาสตร์ เพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์แล้วจึงทำการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง และนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activities) โดยร่วมมือกับนักวิทยาศาสตร์สาขาเภสัชวิทยา จุลชีววิทยา เป็นต้น ที่อาจนำไปสู่การค้นพบตัวยาชนิดใหม่ ดังที่ปรากฏในประเทศอุตสาหกรรมที่มีการผลิตยาสังเคราะห์หลายชนิด โดยเลียนแบบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สกัดจากพืชหรือดัดแปลงลักษณะโครงสร้างเพื่อให้ได้ยาชนิดต่างๆ มากมาย ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ใช้เป็นยารักษาโรคเช่น Plaunotol 1 เป็นสารจำพวก Diterpene alcohol สกัดแยกได้จากใบเปล้าน้อย (*Croton sublylatus* Kurz.) ใช้รักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้



2.1 สารสำคัญในพืชสมุนไพร [8]

สารเคมีในพืชสมุนไพร จำแนกได้เป็น 2 จำพวกคือ

1. สารปฐมภูมิ (Primary metabolite) เป็นสารที่พบในพืชชั้นสูงทั่วไปพบได้ในพืชเกือบทุกชนิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) โดยพืชดูดน้ำ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงานจากแสงแดดเพื่อสร้างสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต ด้วยเหตุนี้พืชเกือบทุกชนิดจึงประกอบด้วยแป้งและน้ำตาล สารเหล่านี้มนุษย์ได้นำมาใช้เป็นอาหาร นอกจากนี้สารปฐมภูมียังรวมถึงสารจำพวกไขมัน โปรตีน เม็ดสี (pigment) และเกลืออนินทรีย์ (Inorganic salt) ชนิดต่างๆ อีกด้วย

2. สารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) เป็นสารประกอบที่มีลักษณะค่อนข้างพิเศษต่างกันในพืชแต่ละชนิด คาดว่าสารเหล่านี้เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ (Biosynthesis) ในพืช ซึ่งกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารเคมีแต่ละชนิดจะมีกระบวนการที่แตกต่างกัน เนื่องจากสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ต่างกันนอกจากนี้ในแต่ละกระบวนการก็จะใช้เอนไซม์ (enzyme) ที่เฉพาะเจาะจงแตกต่างกันอีกด้วยโดยเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาต่างๆในพืช ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ได้แก่ แอลคาลอยด์ ไกลโคไซด์ น้ำมันหอมระเหย สารในกลุ่มนี้ส่วนมากจะมีสรรพคุณทางยาหรือเป็นสารพิษ สารเคมีในพืชสมุนไพรมีมากมายหลายชนิด บางชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacological action)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งมักเรียกว่าสารสำคัญ (active constituents) สามารถนำมาใช้เป็นยา นอกจากนี้ยังใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารและเครื่องสำอาง ซึ่งอาจแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 7 กลุ่มดังนี้

1. คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates) เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน (carbon) ไฮโดรเจน (hydrogen) และออกซิเจน (oxygen) โดยไฮโดรเจนและออกซิเจนมักพบในสัดส่วน 2:1 เป็นกลุ่มสารที่พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ คาร์โบไฮเดรตในพืชสร้างขึ้นจากการสังเคราะห์แสงและเก็บสะสมไว้ ซึ่งจะถูกนำมาใช้เป็นอาหารของคนและสัตว์ คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรตที่นำมาใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรม เช่น

- แป้ง ใช้เป็นสารช่วยเพิ่มปริมาณ (diluent) และสารช่วยการแตกตัวยาเม็ด (disintegrating agent)

- น้ำผึ้ง ประกอบด้วยกลูโคส (glucose) 1 และฟรุคโทส (fructose) 2 เป็นส่วนใหญ่ ใช้เป็นส่วนประกอบในยาแก้ไอ ใช้เตรียมน้ำเชื่อมและมีฤทธิ์เป็นยาระบายอ่อนๆ

- วุ้น (agar) เป็นสารจำพวกคอลลอยด์ (colloid) ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีแดง ประกอบด้วยอะกาโรส (agarose) ซึ่งเป็นส่วนทำให้วุ้นแข็งตัว และอะกาโรเพกทิน (agarpectin) ซึ่งเป็นส่วนที่เกี่ยวกับความหนืดของวุ้น ใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวของผลิตภัณฑ์ (stabilizing agent) สารช่วยในการเตรียมอิมัลชัน (emulsifying agent) และใช้เป็นยาระบาย



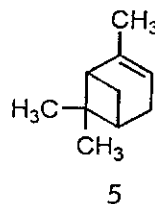
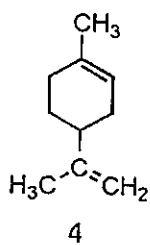
2. ไขมัน (Lipids) เป็นเอสเทอร์ที่เกิดจากกรดไขมันที่มีโมเลกุลยาว (long chain fatty acid) จับกับแอลกอฮอล์ นำมาเป็นอาหารหรือใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม เช่น

- น้ำมันถั่วเหลืองหรือน้ำมันข้าวโพด ใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับยาฉีด ใช้เตรียมอิมัลชัน (emulsion) และใช้เป็นอาหาร

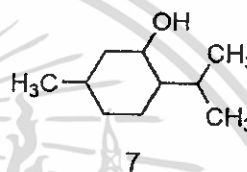
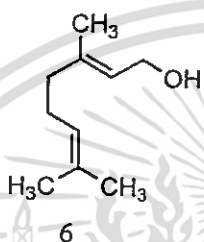
- น้ำมันมะกอก ใช้เป็นสารหล่อลื่น (emollient) และใช้เป็นยาระบาย เป็นต้น

3. น้ำมันหอมระเหย (volatile oils หรือ essential oils หรือ ethereal oils) พบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ดอก ใบ ผล กลีบเลี้ยง เป็นต้น มีลักษณะเป็นน้ำมันที่มีกลิ่นและรสเฉพาะตัว ระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิธรรมดา ไม่มีสี แต่เมื่อทิ้งไว้นานๆ อาจถูกออกซิไดส์ (oxidised) ทำให้สีเข้มขึ้น จึงต้องเก็บไว้ในขวดสีชาที่ปิดสนิท น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยส่วนประกอบทางเคมีซึ่งซับซ้อน อาจจำแนกน้ำมันหอมระเหยตามชนิดขององค์ประกอบได้หลายกลุ่มดังนี้

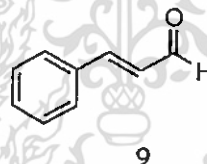
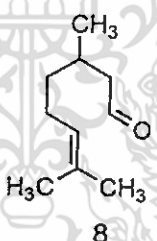
3.1 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกไฮโดรคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลัก (hydrocarbon volatile oils) เช่น limonene 4 ในน้ำมันกระวาน (cardamom oil), pinene 5 ในน้ำมันสน (turpentine oil) และในน้ำมันไพล เป็นต้น



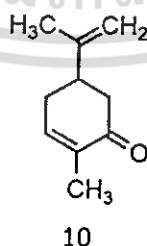
3.2 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบหลัก (alcohol volatile oils) เช่น geraniol 6 ในน้ำมันดอกกุหลาบ (rose oil) และ menthol 7 ในน้ำมันสะระแหน่ (peppermint oil) เป็นต้น



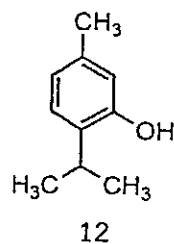
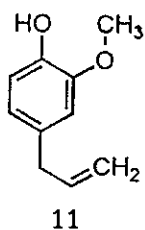
3.3 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกแอลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบหลัก (aldehyde volatile oils) เช่น citronellal 8 ในน้ำมันตะไคร้หอม (citronella oil) และ cinnamaldehyde 9 ในน้ำมันอบเชย (cinnamon oil) เป็นต้น



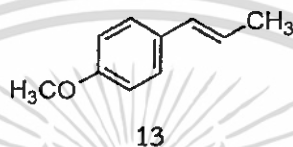
3.4 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกคีโตนเป็นองค์ประกอบหลัก (ketone volatile oils) เช่น carvone 10 ในน้ำมันเทียนตากบ (caraway oil) เป็นต้น



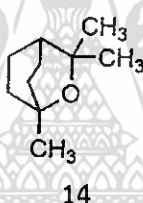
3.5 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกฟีนอลเป็นองค์ประกอบหลัก (phenol volatile oils) เช่น eugenol 11 ในน้ำมันกานพลู (clove oil) และ thymol 12 ในไทม์ออยด์ (thyme oil) เป็นต้น



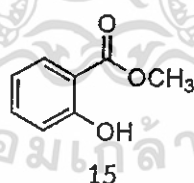
3.6 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกฟีนอลิกอีเทอร์เป็นองค์ประกอบหลัก (phenolic ether volatile oils) เช่น anethole 13 ในน้ำมันจันทน์แปดกลีบหรือน้ำมันโป๊ยกั๊ก (anise oil) และในน้ำมันเทียนข้าวเปลือก (fennel oil) เป็นต้น



3.7 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกออกไซด์เป็นองค์ประกอบหลัก (oxide volatile oils) เช่น eucalyptol 14 ในน้ำมันยูคาลิปตัส (eucalyptus oil) และในน้ำมันเสม็ดขาว (cajuput oil) เป็นต้น



3.8 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกเอสเทอร์เป็นองค์ประกอบหลัก (ester volatile oils) เช่น methyl salicylate 15 ในน้ำมันระกำ (wintergreen oil) เป็นต้น



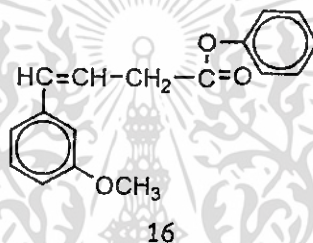
พืชสมุนไพรที่มีน้ำมันหอมระเหยและนำมารักษาโรค เช่น น้ำมันกานพลูจากดอกกานพลู (*Syzygium aromaticum* L.) ในวงศ์เมอรัทาสีอี (Myrtaceae) ใช้บรรเทาอาการปวดฟัน มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ หรือน้ำมันจากเหง้าไพล (*Zingiber cassumunar*) ในวงศ์ขิงขมิ้น (Zingiberaceae) มีฤทธิ์ลดการอักเสบ ฟกช้ำ แก้เคล็ดขัดยอก เป็นต้น

4. เรซินและบาลซัม (resins and balsams) สารในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเรซินและสารประกอบที่มีเรซินเป็นองค์ประกอบ เช่น โอลีโอเรซิน (oleoresins) โอลีโอกัมเรซิน (oleo-gum-resins) และบาลซัม (balsams) เป็นต้น

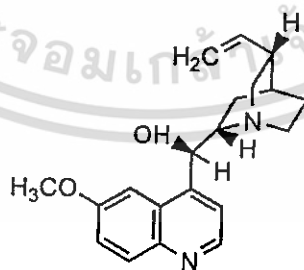
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรซิน เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสารเคมีหลากหลายชนิดรวมกัน ได้แก่ กรดเรซิน (resin acids), เรซินแอลกอฮอล์ (resin alcohols), เรซิน (resene) และเอสเทอร์ (ester) จัดเป็นสารประกอบที่มีรูปทรงอสมมาตรเป็นก้อนแข็ง เมื่อทำให้ร้อนจะเหนียวหนืดและค่อยๆ หลอมละลาย เรซินที่นำมาใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม ได้แก่ ชันสน (rosin หรือ colophony) เป็นเรซินแข็งที่ได้จากสน (*Pinus* spp.) หลายชนิดในวงศ์ไพนาซีอี (Pinaceae) ใช้ทำยาที่มีสีชาอ่อน ใช้เป็นสารช่วยให้ผลิตภัณฑ์แข็งตัว (stiffening agent) ในยาเตรียมขี้ผึ้ง และยังใช้เป็นยาขับปัสสาวะสำหรับสัตว์อีกด้วย

บาลซัม เป็นสารผสมเรซิน (resinous mixture) ประกอบด้วยกรดเบนโซอิก (benzoic acid) หรือกรดซินนามิก (cinnamic acid) หรือกรดทั้งสองชนิดนี้ บาลซัมที่นำมาใช้ในทางเภสัชกรรม ได้แก่ กายาน (benzoin) ได้จากเปลือกต้นของพืชตระกูลสไตแรกซ์ (*Styrax benzoin*) ในวงศ์สไตราซีอี (Styraceae) ในทางการค้ารู้จักกันในชื่อของกายานไทยและกายานสุมาตรา โดยกายานไทยประกอบด้วยผลึก coniferyl benzoate 16 ใช้แต่งกลิ่นเครื่องสำอาง ส่วนกายานสุมาตราใช้ทางยาเป็นองค์ประกอบในคอมพาวด์เบนซอยด์ทิงเจอร์และใช้มากในอุตสาหกรรมแล็กเกอร์



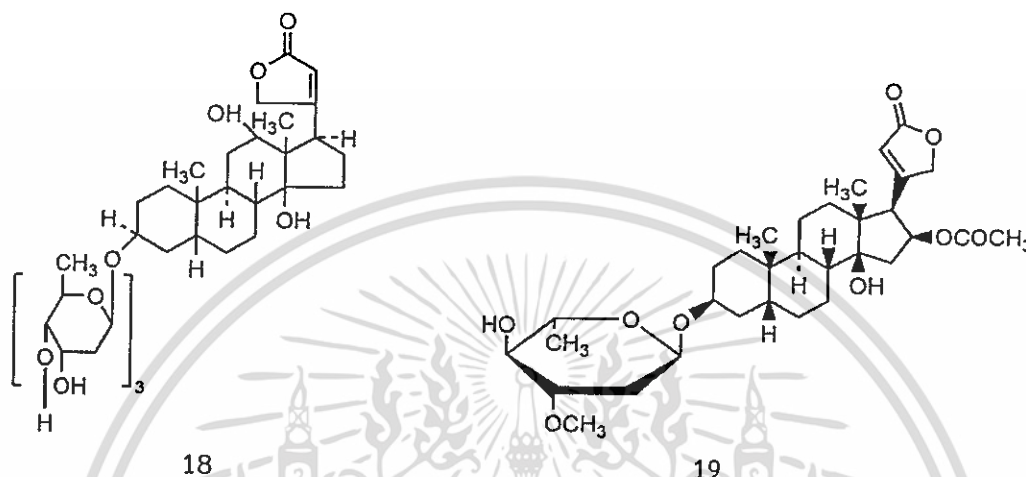
5. แอลคาลอยด์ (alkaloids) เป็นสารประกอบกลุ่มใหญ่มากที่สุดกลุ่มหนึ่งที่ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง พบมากในพืชชั้นสูง เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ คุณสมบัติทั่วไปของแอลคาลอยด์ คือ มักมีรสขม มีฤทธิ์เป็นด่าง ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ มีคุณสมบัติทางเคมี ทางกายภาพ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อมนุษย์และสัตว์แตกต่างกันมาก เช่น quinine 17 จากเปลือกต้นชิงโคนา (*Cinchona succirubra* Pav.) ในวงศ์รูเบียซีอี (Rubiaceae) ใช้รักษาไข้มาลาเรียจากเชื้อพลาสโมเดียมฟาลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) ซึ่งดื้อต่อยาสังเคราะห์คลอโรควิน (chloroquine)



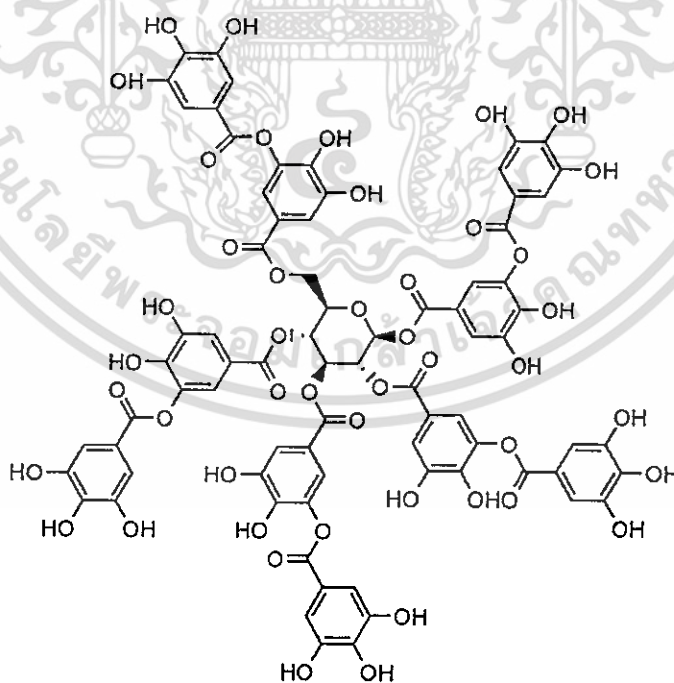
6. ไกลโคไซด์ (glycosides) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยส่วนอะไกลโคน (aglycone) หรือจีนิน (genin) จับกับน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลหรือเรียกส่วนไกลโคน (glycone) จัดเป็นสารกลุ่มใหญ่อีกกลุ่มหนึ่งที่นำมาใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรคอย่างกว้างขวาง และบางชนิดมีฤทธิ์เป็นสารพิษ โดยทั่วๆ ไปไกลโคไซด์จะละลายได้ในตัวทำละลายมีขั้วขึ้นกับจำนวนและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดน้ำตาลของโครงสร้างไกลโคไซด์ของไกลโคไซด์ เมื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะเกิดการสลายพันธะที่เชื่อมต่อกันระหว่างอะไกลโคไซด์และไกลโคไซด์ ตัวอย่างไกลโคไซด์เช่น digoxin 18 จากใบของพืชสกุลดิจิตาลิส (*Digitalis lanata* Ehrh.) มีฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด ใช้รักษาอาการโรคหัวใจที่มีการเต้นผิดปกติของหัวใจหรือ oleandrin 19 จากใบยี่โถ (*Nerium indicum* Mill) มีฤทธิ์เช่นเดียวกับดิจอกซิน เป็นต้น

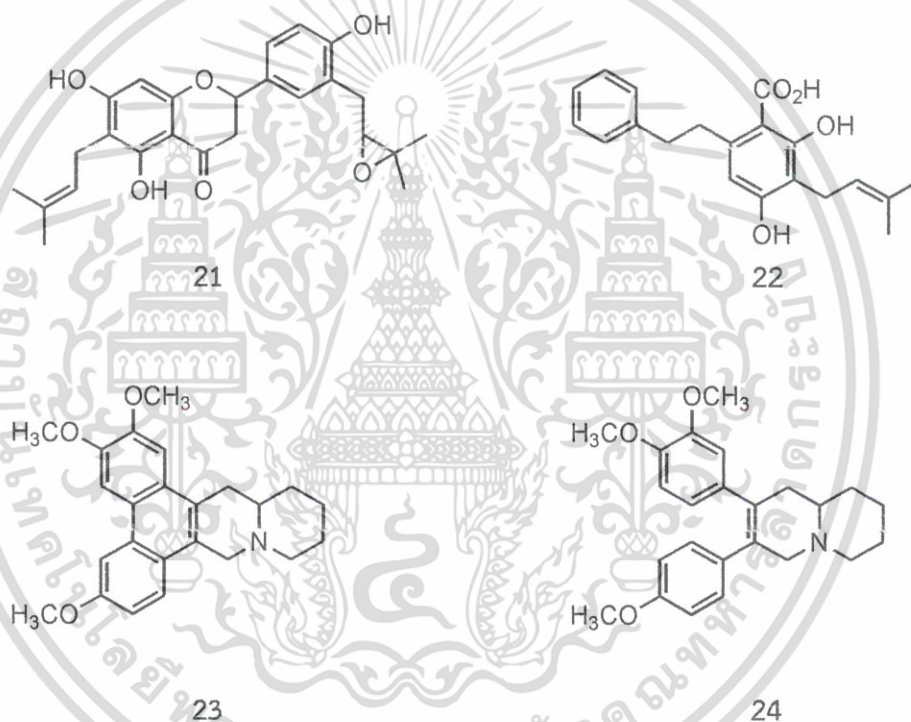


7. แทนนิน (tannins) เป็นสารพวกพอลิฟีนอล (polyphenol) มีโมเลกุลใหญ่และโครงสร้างซับซ้อนเช่น tannic acid 20 พบได้ในพืชหลายชนิด มีรสฝาด จึงใช้เป็นยาฝาดสมาน ยาแก้ท้องเสีย มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง สมุนไพรที่มีแทนนิน เช่น เปลือกทับทิม



2.2 สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial Compounds) [1]

โดยทั่วไปโรคติดเชื้อหมายถึงโรคที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งรวมถึงเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อไวรัส ได้มีการใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากพืชชั้นสูงในการรักษาโรคติดเชื้อมาแต่โบราณ แต่ความก้าวหน้าครั้งสำคัญในการรักษาโรคติดเชื้อได้แก่ การค้นพบยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) ชนิดแรกคือ เพนิซิลลิน อย่างไรก็ตาม ยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันเป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรีย ในขณะที่ยาด้านเชื้อราและเชื้อไวรัสยังมีจำนวนจำกัด ดังนั้นจึงมีความพยายามในการค้นหาใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราและไวรัส สารธรรมชาติที่มีโครงสร้างสลับซับซ้อนมีผลในการออกฤทธิ์เช่น สารกลุ่มฟอลิอิน Flemiflavanone 21 และ Amorphitin A 22 ตัวอย่างของสารอีกกลุ่มหนึ่งที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้แก่ แอลคาลอยด์ Phenanthroquinolizidines เช่น Cryptopleurine 23 และ Julandine 24 เป็นต้น



2.3 ดาวเรือง [9]



ภาพที่ 2.1 ดอกดาวเรือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Tagetes erecta* L.

ชื่อวงศ์ : Compositae

ชื่อสามัญ : Marigold

ชื่อพื้นเมือง : ดอกคำพู้จู้ คำปู้จู้หลวง ดาวเรืองใหญ่ พอทู ดาวเรืองอเมริกัน

ลักษณะทั่วไป : ดาวเรืองเป็นไม้ล้มลุกสูง 15-60 ซม. ใบประกอบแบบขนนก เรียงตรงข้ามใบย่อยรูปวงรี กว้าง 0.5-1.5 ซม. ยาว 1.5-5 ซม. ขอบใบหยักฟันเลื่อย ดอกช่อออกที่ปลายกิ่ง ดอกย่อยมี 2 ลักษณะคือ ดอกไม่สมบูรณ์เพศ คือ อยู่บริเวณรอบนอก จำนวนมากสีเหลืองหรือเหลืองส้ม ลักษณะคล้ายลิ้น บานแผ่ออก ซ้อนกันหลายชั้นปลายมันลง ดอกสมบูรณ์เพศมีลักษณะเป็นหลอดเล็กๆจำนวนมาก รวมกลุ่มอยู่บริเวณกลางช่อดอก ผลเป็นผลแห้งไม่แตกมีสีดำ

การใช้ประโยชน์ :

- ไม้ประดับ
- สมุนไพร
- สีของดอกใช้เป็นสีย้อมผ้า
- เพื่อจำหน่าย ดาวเรืองเป็นไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเช่น ใช้ทำพวงมาลัย
- ป้องกันแมลง เนื่องจากดาวเรืองเป็นสารที่มีกลิ่นเหม็นแมลงไม่ชอบ จึงสามารถใช้เป็นเกราะป้องกันแมลงให้แก่พืชอื่นๆ ในรากของดาวเรืองมีสารชนิดหนึ่งคือ แอลฟาเทอร์เทียนิล (α -terthienyl) ซึ่งเป็นสารที่สามารถควบคุมปริมาณไส้เดือนฝอยในดินได้เป็นอย่างดี
- ดอกดาวเรืองผสมในอาหารสัตว์เป็นอาหารเสริม เนื่องจากดาวเรืองเป็นพืชที่สารแซนโทฟิลล์ (Xanthophylls) สูง จึงสามารถนำไปเป็นส่วนผสมอาหารสัตว์ได้ดี โดยเฉพาะอาหารของไก่ไข่ จะทำให้ไข่แดงมีสีแดงสดใสน่ากินยิ่งขึ้น
- สารสกัดจากดอกดาวเรืองจะให้สารสำคัญคือ Lutein 25 ซึ่งเป็นสารอาหารในกลุ่มที่เรียกว่าแซนโทฟิลล์ (xanthophylls) มีลักษณะเป็นสารสีเหลือง อยู่ในจำพวกแคโรทีนอยด์ (carotenoids) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่ามีประโยชน์ต่อดวงตาเพราะเป็นสารสำคัญที่อยู่ในจุดรับภาพของดวงตาที่เรียกว่า “มาคูลา (Macula)” สารอาหารลูทีนจะช่วยกรองแสงหรือป้องกันรังสีที่จะทำให้เกิดอันตรายต่อดวงตา นอกจากนี้ลูทีนยังช่วยปกป้องไม่ให้เซลล์ของจอประสาทตาถูกทำลาย และยังช่วยลดความเสี่ยงในการเป็นโรคต้อกระจก (Cataracts) โรคกระจกตาเสื่อม (AMD) ซึ่งชาวต่างประเทศรู้จักสารอาหารลูทีนกันอย่างกว้างขวางว่าเป็นสารอาหารที่ช่วยชะลออาการจอประสาทตาเสื่อมของผู้ใหญ่ จึงมีการศึกษาประโยชน์ของลูทีนที่มีต่อการปกป้องจอประสาทตาเพิ่มมากขึ้น บทบาทของลูทีนที่มีต่อดวงตานั้น พบว่าภายในจอประสาทตาของคนเรามีร่องเล็กๆ อยู่จุดหนึ่งที่มีเซลล์รับภาพจอประสาทตา ซึ่งเป็นจุดที่แสงตกกระทบและทำให้คนเราสามารถมองเห็นภาพที่ชัดเจนในแต่ละวัน ซึ่งบริเวณเซลล์รับภาพนี้มีสารสีเหลืองหรือลูทีนอยู่หนาแน่นมากที่สุด โดยจะพบได้ตรงชั้นเนื้อเยื่อที่หล่อเลี้ยงเส้นประสาท ซึ่งจุดดังกล่าวเป็นจุดที่สำคัญมากต่อการมองเห็น หากบริเวณดังกล่าวเสื่อมหรือเสียไป อาจทำให้สูญเสียการมองเห็นหรือตาบอดได้ โดยสารลูทีนในเซลล์รับภาพของจอประสาทตานี้ จะทำหน้าที่สำคัญคือ คอยกรองแสงสีฟ้า ซึ่งเป็นอันตรายต่อจอประสาทตา และเป็นแสงที่หลีกเลี่ยงได้ยากเพราะมีอยู่ทั่วไปรอบๆ ตัวเรา ทั้งแสงจากดวงอาทิตย์ แสงจากโทรทัศน์ แสงจากจอคอมพิวเตอร์ แสงจากหลอดไฟ เป็นต้น

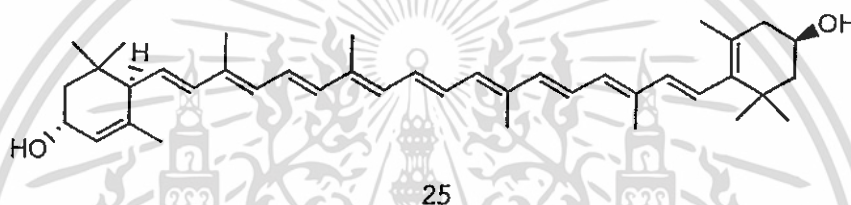
นอกจากนี้ลูทีนยังทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในดวงตาของคนเรานอีกด้วย เพราะดวงตาของเราจะมีสารอนุมูลอิสระอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งจะเป็นตัวทำลายเซลล์รับภาพและทำให้เกิดโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกี่ยวกับจอประสาทตาทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ได้ ลูทีนจะพบมากในดวงตาของเราแล้ว ยังพบได้ในสมอง ในส่วนที่เกี่ยวกับการมองเห็นถึงร้อยละ 66 จึงเชื่อว่าลูทีนมีส่วนช่วยในการรับภาพและส่งต่อไปยังสมอง ได้ดีขึ้นอีกด้วย

หน้าที่ของลูทีนในการปกป้องดวงตา คือ

1. ป้องกันและชะลอโรคจอประสาทตาเสื่อม โดยเข้าไปดูแลบริเวณจุดรับภาพของดวงตา (Macula) จากการศึกษาพบว่า การรับประทานลูทีนอย่างน้อยวันละ 5 มิลลิกรัม สามารถลดความเสี่ยงของโรคจอประสาทตาเสื่อมได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์
2. ปกป้องอนุมูลอิสระและกรองแสงที่จะมาทำลายดวงตา ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคจอประสาทตาเสื่อม
3. ป้องกันการอุดตันของหลอดเลือดบริเวณดวงตา
4. ป้องกันและลดอาการของโรคต้อกระจก [10]



สรรพคุณทางยา :

ใบ มีสรรพคุณพอกแผลฝี ทาแผลเน่าเปื่อย น้ำคั้นจากใบแก้ปวดหู
ดอก แก่ริดสีดวงทวาร ขับเสมหะแก้เจ็บตา เวียนศีรษะ ไอกรน คางทูม

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

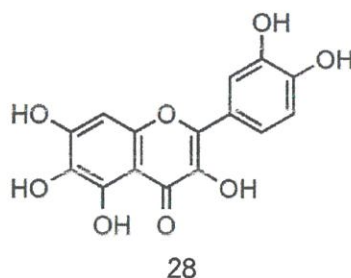
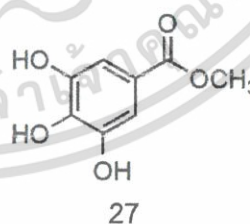
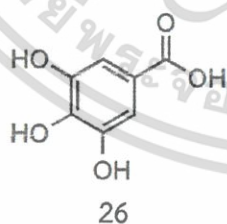
Cetkovic และคณะ [11] ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกดาวเรือง *Calendula arvensis* L. (GWM) ซึ่งเป็นพันธุ์ป่า และดอกดาวเรือง *C. officinalis* L. (CM) ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูก โดยการนำสารสกัดหยาบเมทานอลและน้ำของดอกดาวเรือง ในช่วงความเข้มข้นของ 0.10-0.90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยอนุมูลอิสระ 3 ชนิด คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), hydroxyl radical และ lipid peroxy radical ด้วยกระบวนการ Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy พบว่าสารสกัด CM มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัด GMW ขณะที่สารสกัดหยาบเมทานอลแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารสกัดจากชั้นน้ำ โดยสารสกัดชั้นน้ำของ CM มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด เนื่องจากสารสกัด 0.75 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถกำจัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) ได้อย่างสมบูรณ์ ในระบบเฟนต์อน (Fenton system) และที่ความเข้มข้นเดียวกันของสารสกัดนี้สามารถกำจัด DPPH ได้ 92 เปอร์เซ็นต์ และอนุมูลอิสระเปอร์ออกซี (peroxy radical) ได้ 95 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงที่เกิดออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) โดยคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจะสัมพันธ์กับปริมาณของสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (14.49-57.47 มิลลิกรัม/กรัม) และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (5.26-18.62 มิลลิกรัม/กรัม) ที่มีอยู่ในสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

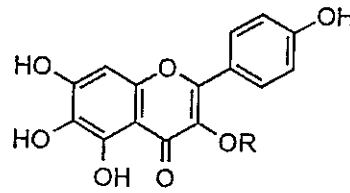


ภาพที่ 2.2 *C. arvensis* L. (GWM) และ *C. officinalis* L. (CM)

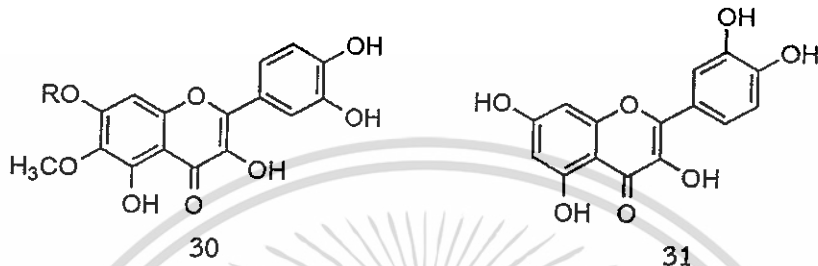
Gong และคณะ [12] ได้ทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดดอกดาวเรืองด้วยแอลกอฮอล์หลายชนิด พบว่าตัวทำละลายที่หลากหลายมีแนวโน้มที่ทำให้ได้ปริมาณของโพลีฟีนอลจากสารสกัดหยาบของดอกดาวเรืองที่ไร้ไขมันแตกต่างกัน โดยชั้นสารสกัดหยาบเอทิลแอลกอฮอล์ (เอทานอล)/น้ำ (7:3, v/v) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์มากที่สุด คือ 62.33 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้ง (GAE/g) และ 97.00 มิลลิกรัมสมมูลรูทีน/กรัมน้ำหนักแห้ง (RE/g) และตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยใช้ 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) และ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) จากนั้นวัดความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay พบว่าปริมาณการต้านอนุมูลอิสระขึ้นกับปริมาณของสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ ($R^2 > 0.900$) และองค์ประกอบจากสารสกัดหยาบที่ได้จากการรวมกันของ HPLC-ABTS+ post-column assay และ HPLC-DAD-MS method พบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญคือ Gallic acid 26, gallicin 27, quercetagenin 28, 6-hydroxykaempferol-O-hexoside 29, patuletin-O-hexoside 30 และ quercetin 31 โดยสารสกัดที่มีฤทธิ์ดีที่สุดคือ quercetagenin 28



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



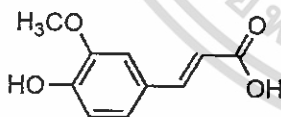
29



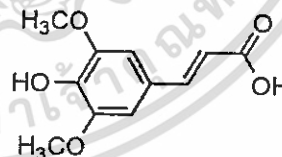
30

31

Kaisoon และคณะ [13] ได้ทำการศึกษาสารประกอบฟีนอลและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของดอกไม้ 12 ชนิดจากประเทศไทยที่สามารถนำมาบริโภคและใช้เป็นส่วนผสมในการปรุงอาหาร ซึ่งพบว่าซีเหล็ก (*Cassia siamea*) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงสุด (TPC) เทียบเท่ากับกรดแกลลิก (GAE) 88 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง ส่วนดาวเรือง (*T. erecta*) มีปริมาณฟลาโวนอยด์ (flavonoid) รวมสูงสุด (TFC) 68.9 mg มิลลิกรัมสมมูลรูทีน/กรัม น้ำหนักแห้ง นอกจากนี้พวงชมพู (*Antigonon leptopus*) และดาวเรือง (*T. erecta*) ยังพบสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์สูงที่สุดซึ่งวัดโดยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay คือ 62.0 และ 60 มิลลิโมลสมมูลเฟอร์รัสซัลเฟต/100 กรัม น้ำหนักแห้ง (mmol FeSO₄/100 g) โดยสารประกอบกรดฟีนอลที่สำคัญนี้เป็น gallic acid 26, ferulic acid 32 และ sinapic acid 33 ขณะที่ฟลาโวนอยด์มากกว่า quercetin 31 ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าดอกไม้ที่สามารถบริโภคได้เป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลและสารต้านอนุมูลอิสระ



32

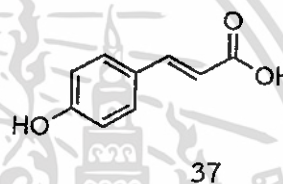
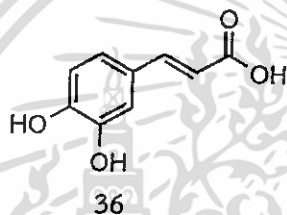
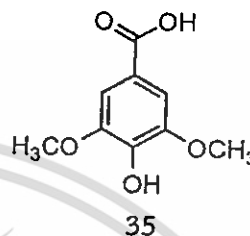
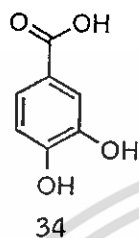


33

Siriamornpun และคณะ [14] ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงสี ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและแคโรทีนอยด์ (ไลโคปีน, เบต้าแคโรทีน, ลูทีน) ของดอกดาวเรืองที่เป็นผลมาจากกระบวนการอบแห้งที่แตกต่างกันคือ การตากแห้ง (FD) การอบแห้งด้วยลมร้อน (HA) และการใช้รังสีอินฟราเรดย่านไกล (far-infrared) ร่วมกับการหมุนเวียนอากาศร้อน (FIR-HA) เมื่อศึกษาสีของแคโรทีนอยด์ (ไลโคปีน, เบต้าแคโรทีน, ลูทีน) และสารประกอบฟีนอลของสารสกัดหยาบดาวเรือง พบว่าการทำให้แห้งด้วย FIR-HA มีการเปลี่ยนแปลงสีของดาวเรืองน้อยกว่าวิธีการ FD และ HA นั่นคือวิธีการในการอบแห้งที่แตกต่างกันส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ โดย HA ให้ปริมาณของเบตาแคโรทีนสูงสุด (15.5 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัม น้ำหนักแห้งของสารสกัด)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขณะที่ FIR-HA และ FD ให้ปริมาณลูทีน (lutein) และไลโคปีน (lycopene) สูงสุด ส่วนกรดฟีนอลที่สำคัญของดอกดาวเรืองคือ *p*-coumaric acid, ferulic acid และ sinapic acid โดยพบว่ามี gallic acid, protocatechuic acid 34, syringic acid 35, caffeic acid 36, และ *p*-coumaric acid 37 ในปริมาณสูงหลังจากผ่านกระบวนการ FIR-HA แสดงให้เห็นว่า FIR-HA เป็นวิธีการอบแห้งดาวเรืองที่เหมาะสมเพื่อใช้รักษาสี คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพ



Hossain และคณะ [15] ได้ทำการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดอินทรีย์ต่างๆ จากใบของพืชเขตร้อน คือ *Tetrastigma* (เถาองุ่นป่า) จากซาบารห์ โดยการนำใบแห้งของ *Tetrastigma* มาบดละเอียดแล้วนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่แตกต่างกัน คือ เฮกเซน เอทิล แอซิเตต คลอโรฟอร์ม บิวทานอล และเมทานอล แล้วนำน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดอินทรีย์ชั้นต่างๆ ที่ได้คือ สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ชั้นเอทิล แอซิเตต ชั้นคลอโรฟอร์ม ชั้นบิวทานอลและชั้นเมทานอลไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (Total phenolic contents) และสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu และทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยใช้ 2,2-diphenyl- 2-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่าสารสกัดชั้นเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงสุดคือ 386.22 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือสารสกัดชั้นเอทิล แอซิเตต ชั้นคลอโรฟอร์ม ชั้นเฮกเซน และชั้นบิวทานอล คือ 190.89, 175.89, 173.44 และ 131.72 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนน้ำมันหอมระเหยไม่พบสารประกอบฟีนอล ผลการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยใช้วิตามินซี (ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐานพบว่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ สารสกัดหยาบเมทานอล > สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต > สารสกัดหยาบคลอโรฟอร์ม > สารสกัดหยาบบิวทานอล > สารสกัดหยาบเฮกเซน และน้ำมันหอมระเหยไม่มีผลในการต้านออกซิเดชัน ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดทั้งหมดสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลที่มีอยู่ในสารสกัดนั้น โดยใบของ *Tetrastigma* ที่อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอล อาจจะเป็นแหล่งที่ดีของสารต้านออกซิเดชัน

Rojas และคณะ [16] ศึกษาองค์ประกอบและฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจาก *T. patula* L. ที่เก็บจากเทือกเขาในประเทศเวเนซุเอลาพบองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เฉพาะในโครงการวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำออกจำหน่าย การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้แก่ pipertone, *trans*- β -ocymene, terpinolene และ β -caryophyllene และพบว่าน้ำมันหอมระเหยของ *T. patula* สามารถออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ดี เช่น *S. aureus* ATCC 25923 และ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 มีวงไฮแสดงการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเท่ากับ 22 มิลลิเมตร และ 27 มิลลิเมตร ตามลำดับ

Shrotri และคณะ [17] ศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดด้วยน้ำร้อนน้ำเย็น และเมทานอลจาก *T. patula* และ *T. erecta* พบว่าสารสกัดเมทานอลของ *T. erecta* มีวงไฮแสดงการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสูงสุดเท่ากับ 26 มิลลิเมตร ต่อเชื้อ *Aeromonas sorbis*, *A. hydrophila*, *S. aureus* MTCC 7405 และ *S. aureus* (clinical isolate)

Ibrahim และ Kiranmai [18] ศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากใบและดอกของ *T. erecta* พบว่าสารสกัดอีเทอร์ของใบและสารสกัดเอทิล แอซิเตตของดอก มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus cereus* และ *S. aureus*) และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *P. aeruginosa*)

Raghuveer และคณะ [19] ทำการสกัดรวมของทุกส่วนของ *T. erecta* ด้วย 90% เมทานอลโดยใช้เครื่อง Soxhlet หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบเมทานอลมาทดสอบผลต่อการลดไขมัน (antihyperlipidemic) ในหนูปริมาณ 200 และ 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นเวลา 30 วัน พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลมีผลต่อการลดไขมันในหนู

Devika และ Koilpillai [20] ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ *T. erecta* โดยทำการสกัดส่วนกิ่งก้าน ใบ ดอก และ ราก ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ อีเทอร์และเอทานอล พบว่าองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของกิ่งก้าน ใบ ดอก และราก ได้แก่ สารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ แอลคาลอยด์ ควินโนน เทอร์พีน และคูมาริน

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 แหล่งของพืชที่ใช้ในการทดลอง

ใบดาวเรือง (*Tagetes erecta* L.) มีระยะเวลาการปลูก 45 วัน เก็บจากแปลงเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

3.2 สภาวะที่ใช้ในการทดลอง

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นำมาใช้ในการสกัดและการทำโครมาโทกราฟีได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตต และเมทานอล จะถูกนำมาล้างที่อุณหภูมิจุดเดือดของตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

การจัดกลุ่มสารสำคัญและการแยกสารให้บริสุทธิ์ทำโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีคือ คอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลของ Scharlau GE0048 ขนาด 0.02-0.06 มิลลิเมตร และคลุกสารสกัดหยาบหรือสารที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ก่อนการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยซิลิกาเจลของ CARLO ERBA ขนาด 0.06-0.2 มิลลิเมตร สำหรับ ส่วนthin layer chromatography (TLC) ใช้ซิลิกาเจล 60 F₂₅₄ บนแผ่นอะลูมิเนียม จุดของสารสำคัญพิสูจน์ด้วยการดูคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ต (ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร) และใช้รีเอเจนต์ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับสารสำคัญได้แก่ anisaldehyde-H₂SO₄ reagent ป้ายบนแผ่น TLC แล้วนำไปให้ความร้อนบนแผ่นนำความร้อน (hot plate) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

สเปกตรัม ¹H NMR และ ¹³C NMR ถูกบันทึกด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300 ที่ความถี่ 300 เมกะเฮิร์ต การเตรียมตัวอย่างทำโดยละลายสารตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย CDCl₃ สเปกตรัม ¹H NMR จะปรากฏตำแหน่งสัญญาณโปรตอนของ CDCl₃ ที่ δ 7.27 ppm สำหรับสเปกตรัม ¹³C NMR ปรากฏตำแหน่งสัญญาณของคาร์บอน ที่ δ 77.0 ppm ตามลำดับ

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. เก็บตัวอย่างใบดาวเรืองที่เจริญเติบโตสมบูรณ์ ไม่มีโรคและแมลงรบกวน ล้างด้วยน้ำ ฝึกลง แล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนแห้ง และนำมาบดให้ละเอียด

2. เตรียมสารสกัดหยาบเมทานอล โดยการแช่ใบดาวเรือง เป็นเวลา 7 วัน จำนวน 3 ครั้ง กรองแยกกาก และนำของเหลวผลกรองไประเหยเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจะได้สารสกัดหยาบเมทานอล

3. จัดกลุ่มสารสำคัญโดยนำสารสกัดหยาบเมทานอลมาสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน (Solvent Partitioning Extraction) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตต และบิวทานอล ตามลำดับ และทำการระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่องระเหย

สูญญากาศ ได้สารสกัดหยาบของตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิดได้แก่ สารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไตรคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต และสารสกัดหยาบบิวทานอล ตามลำดับ

4. นำสารสกัดหยาบในแต่ละชั้นมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี Disc diffusion method

5. วิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC; Minimum inhibitory concentration)

6. วิเคราะห์กลุ่มสารที่พบในสารสกัดด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี

7. จัดกลุ่มสารและแยกสารออกฤทธิ์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟี

3.4 การเตรียมสารสกัดหยาบเมทานอล

1. นำใบดาวเรืองแห้งที่บดละเอียด 1.20 กิโลกรัม แช่ด้วยเมทานอล ปริมาตร 4 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ทำการคนของผสม จากนั้นนำมาอุ่นในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส วันละ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

2. กรองสารสกัดผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ได้ของเหลวผลกรองชั้นเมทานอล จากนั้นระเหยเมทานอลด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ ส่วนกากนำมาแช่ด้วยเมทานอลเช่นเดียวกับข้อ 1

3. นำสารสกัดหยาบเมทานอลมาทำการสกัดแบบแบ่งส่วน ดังแผนภาพที่ 3.1

3.5 การแยกสารสกัดหยาบโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี

เมื่อวิเคราะห์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในแต่ละชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ จะนำสารสกัดหยาบในชั้นที่ให้ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ดีที่สุดที่สุดมาแยกออกเป็นสารส่วนย่อย โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และเทคนิคทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้เทคนิคทั้งสองควบคู่กัน มีวิธีดำเนินการดังนี้

1. แบ่งสารสกัดหยาบมาหาระบบตัวทำละลายในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยเทคนิค TLC (Thin Layer Chromatography) พบว่าการแยกของสารชัดเจนที่สุด และเก็บสารสกัดหยาบชั้นนี้ไว้สำหรับเทียบ TLC ของสารส่วนย่อยในการแยกโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

2. ทำการตัดแผ่น TLC ขนาด 2 x 5 เซนติเมตร จากนั้นทำการขีดเส้นจากปลายขอบบนและขอบล่างของแผ่น TLC (เพื่อกำหนดระยะทางที่ตัวทำละลายพาสารที่ต้องการแยกเคลื่อนที่ไป) จากนั้นทำการจุดสารที่ได้จากสารสกัดหยาบที่แยกได้หลังทำการระเหยตัวทำละลายออก แล้วแบ่งออกมาใส่ในขวดเก็บสาร และทำการจุดสารลงบนแผ่น TLC

3. เตรียม TLC แท็งค์ โดยทำให้ในแท็งค์อิมมัวด้วยตัวทำละลายในอัตราส่วนต่างๆ ที่เตรียมไว้ โดยใช้กระดาษกรองวางไว้ด้านในแท็งค์ และปิดด้วยกระจก

4. ทำการทดสอบอัตราส่วนของสารละลายที่มีความเข้มข้นต่างๆ โดยเริ่มจากสารละลายที่มีขีดต่างกันในอัตราส่วน 1:90 จากนั้นวางแผ่น TLC ลงใน TLC แท็งค์ ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งตัวทำละลายเคลื่อนที่มาถึงเส้นด้านบนที่ขีดไว้ ถ้าสารแยกออกจากกันได้ดีจะพบการแยกของสารเกิดขึ้นเป็นจุดที่ชัดเจน ถ้าไม่พบเป็นจุดชัดเจนให้ทำการเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของตัวทำละลายในอัตราส่วนที่

เหมาะสม เพื่อหาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการแยกสาร พิจารณาได้จากค่า R_f (Retardation factor) ไม่ควรมากกว่า 0.3

5. นำแผ่น TLC มาทดสอบการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร จากนั้นทำการวงจุดที่เห็นเป็นสารเรืองแสง

6. ป้ายรีเอเจนต์ที่ทำให้เกิดสีเฉพาะตัวของสาร (anisaldehyde- H_2SO_4 reagent) ให้ทั่วทั้งแผ่น TLC แล้วนำไปวางบนแผ่นให้ความร้อน (Hot plate) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีในบริเวณที่ด้วงไว้ ทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลง

7. เมื่อได้อัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสม นำมาใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography)

3.6 การเตรียมคอลัมน์และการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

1. เตรียมคอลัมน์แบบ Slurry โดยใช้ซิลิกาเจล ขนาด 0.02-0.06 มิลลิเมตร ทำให้เป็นของเหลวชั้นในตัวทำละลาย

2. ใช้สำลีที่ชุ่มด้วยตัวทำละลายอุดที่ปลายคอลัมน์ เทซิลิกาเจลที่เตรียมไว้ลงในคอลัมน์

3. ทำการปรับผิวหน้าของซิลิกาเจลให้เรียบและแน่น ทำการป้องกันพื้นผิวด้านบนของซิลิกาเจลด้วยทราย

4. ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบ ละลายด้วยตัวทำละลายลงไปเล็กน้อย จากนั้นใส่ซิลิกาเจลขนาด 0.06-0.20 มิลลิเมตร คลุกให้เข้ากัน ทำการระเหยตัวทำละลายออกให้หมดและเทใส่ลงในคอลัมน์

5. ใช้ตัวทำละลายชะคอลัมน์จากนั้นทำการเพิ่มหัวของตัวทำละลายทีละน้อยอย่างต่อเนื่อง เพื่อแยกสารที่ต้องการออกจากคอลัมน์

6. เก็บสารที่ออกจากคอลัมน์ ตรวจสอบสารด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี พร้อมทำการตรวจสอบการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร แล้วทดสอบด้วย anisaldehyde reagent

7. จัดกลุ่มสารโดยรวมสารส่วนย่อยให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยพิจารณาจากแผ่น TLC ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

3.7 การแยกสารส่วนย่อยจากชั้นสารสกัดหยาบด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

1. เตรียมคอลัมน์ตามวิธีในหัวข้อ 3.6

2. นำสารสกัดหยาบที่ผสมกับซิลิกาเจลลงในคอลัมน์โดยไม่ต้องทำการกลั่นขวดกันกลม ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ประมาณ 700 มิลลิลิตร เป็นตัวชะ จากนั้นทำการเพิ่มหัวตัวทำละลายอย่างต่อเนื่องด้วยเอทิล แอซิเตต เพื่อแยกสารที่ต้องการออกจากคอลัมน์

3. เริ่มเก็บสารที่ถูกชะอยู่ห่างจากปลายคอลัมน์ประมาณ 5 เซนติเมตร โดยเก็บสารที่ออกจากคอลัมน์ด้วยขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร เก็บประมาณ 20 มิลลิลิตร (หรือหลอดทดลอง) และทำการตรวจสอบสารในแต่ละขวดด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography) ทำการเพิ่มหัวของตัวทำละลายและทำการตรวจสอบด้วยการส่องแสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร แล้วทดสอบด้วย anisaldehyde reagent

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เมื่อสารที่ต้องการแยกออกมาให้ทำการจดบันทึกว่า เริ่มออกจากเวลาที่เท่าใดและจำนวนเท่าใด รวมสารที่แยกด้วยแผ่น TLC ถ้าสารออกมาเหมือนกันให้ทำการรวมสารละลายที่แยกออกมาได้เข้าด้วยกันแล้วทดสอบ TLC อีกครั้งจึงระเหยตัวทำละลายออก

5. การแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

3.8 การหาค่าประกอบทางเคมีของใบดาวเรือง

การหาค่าประกอบทางเคมีของสารสกัดใบดาวเรืองนำมาวิเคราะห์หาค่าประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมส สเปกโทเมตรี (GC : Agilent Technologies Model 6890N, MS:Agilent Technologies Model 7683) ใช้คอลัมน์ DB-Wax วิเคราะห์ด้วยการคำนวณร้อยละขององค์ประกอบด้วยพื้นที่ใต้พีค FID (Flame Ionization Detector Peak) สภาวะที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สภาวะของ GC-MS ที่ใช้ในการทดลอง

| Instrumentation | |
|-------------------------------|--|
| Chromatographic system: | Agilent 6890 GC |
| Inlet | Split |
| Detector | Agilent 5973 MSD |
| Linear | Split inner (p/n 5183-4647) |
| Column | 30 x 0.25 mm ID, 0.25 μ m HP-5 (J&w 122-7032) |
| Experimental Conditions GC-MS | |
| Inlet temperature | 250 $^{\circ}$ C |
| Injection volumn | 1 μ L |
| Split ratio | 100/1 |
| Carrier gases | Helium, flow rate 1 mL/min |
| Oven temperature | 3 min, 4 $^{\circ}$ C/min, 165 $^{\circ}$ C 5 min, 10 min/min, 290 $^{\circ}$ C 10 min |
| Detection temperature | 290 $^{\circ}$ C |
| Detector gas | Helium |

3.9 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method

การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบ สารส่วนย่อย และสารบริสุทธิ์ที่แยกจากใบดาวเรือง จะทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method ณ หน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสาขาโอบุชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Bauer และคณะ [21] ซึ่งวิธีการทดสอบทั้งสองจะคล้ายคลึงกันสรุปได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. นำเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เก็บไว้บน Trypticase Soy Agar (TSA) เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar (MHA) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อราใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud Dextrose Agar (SDA) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. หลังจากนั้นทำการเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกกระตุ้นแล้วลงมาใน 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ ปรับให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 Mcfarland
3. นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมได้มาเพาะลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Ager อยู่ โดยการขีดลงบนหน้าวุ้นให้ทั่วจำนวน 3 ครั้ง ทำให้ได้จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ อยู่บนหน้าวุ้น
4. หลังจากนั้นนำแผ่นดิสก์ขนาด 0.6 มิลลิเมตร ที่มีสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งละลายด้วย DCM วางบนผิววุ้นที่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จากนั้นทำการบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 3.2)
5. อาหารสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ใช้เป็นชนิด Sabouraud Agar และทำการบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งอุณหภูมิและเวลาขึ้นอยู่กับเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด
6. ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone ที่เกิดขึ้น (ภาพที่ 3.3)

ทดสอบการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซีเตต และบิวทานอล จะทำการทดสอบ ณ หน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ส่วนยีสต์ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยใช้ความเข้มข้นของสารตัวอย่างเท่ากับ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (1 ไมโครกรัม/disc) กรณีทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียใช้ Penicillin Ampicillin Gentamicin Caftazidime และ Clavulanic acid เป็นตัวยาเปรียบเทียบ และกรณีทดสอบกับเชื้อราใช้ Nystatin เป็นตัวยาเปรียบเทียบ ในแต่ละชุดการทดลองจะใช้ DMSO เป็นชุดควบคุม

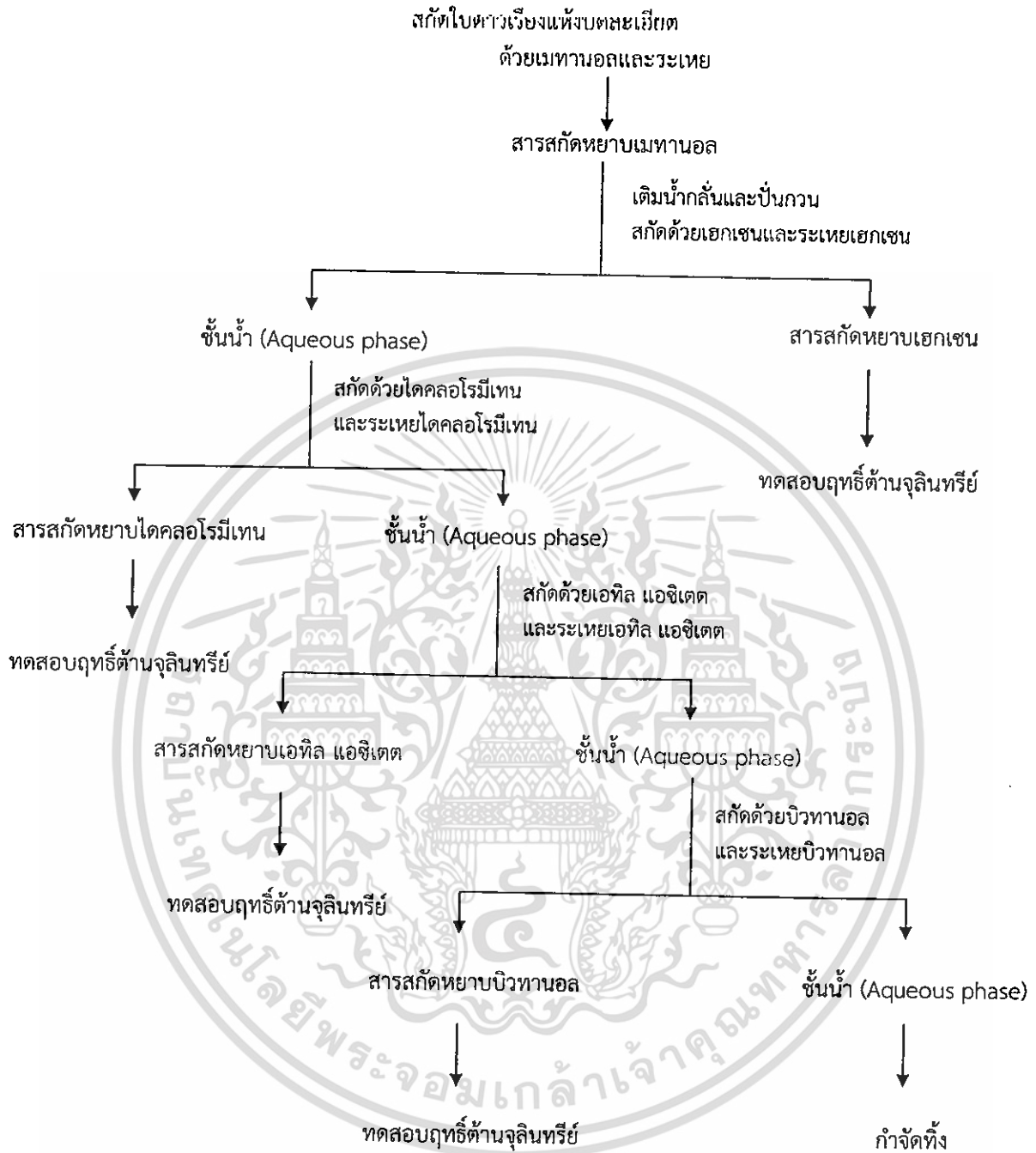
และทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซีเตต และบิวทานอล สารส่วนย่อย และสารบริสุทธิ์ จะทำการทดสอบ ณ สาขาโอสถูวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ 18 ชนิด แบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิดได้แก่ *Bordetella pertussis* และ *Vibrio cholera* แบคทีเรียแกรมบวก 16 ชนิดได้แก่ *Streptococcus milleri* group, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20626, *S. aureus* (MRSA) 20627, *S. aureus* (MRSA) 20630, *S. aureus* (MRSA) 20631, *S. aureus* (MRSA) 20633, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (MRSA) 20644, *S. aureus* (MRSA) 20645, *S. aureus* (MRSA) 20652, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 ส่วนยีสต์ 3 ชนิดได้แก่ *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*. ตัวยาเปรียบเทียบได้แก่ Penicillin Amoxicillin และ Vancomycin เป็นตัวยาเปรียบเทียบ ในแต่ละชุดการทดลองจะใช้ DMSO เป็นชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การอ่านผลการทดลองพิจารณา ดังนี้: ถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 2 มิลลิเมตร แต่น้อยกว่า 5 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับอ่อน (weak) ถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร แต่น้อยกว่า 8 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับปานกลาง (moderate) และถ้าพบวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 8 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบในระดับดี (good)

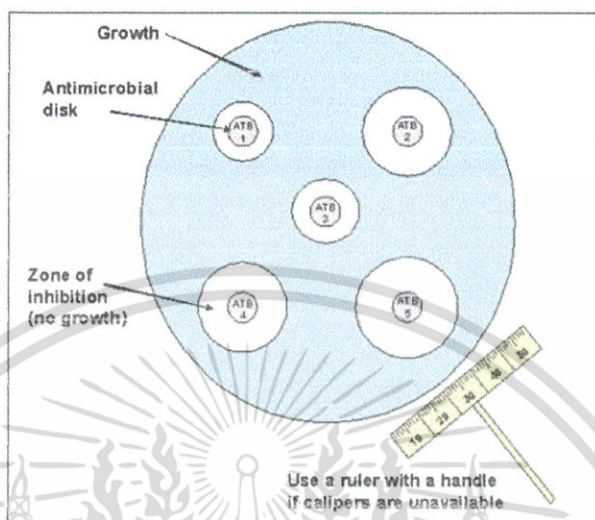


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดด้วยวิธี Solvent Partitioning Extraction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.2 ตัวอย่างของบริเวณของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์
(Zone of inhibition)



ภาพที่ 3.3 วิธีการวัด Zone of inhibition

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 การเตรียมสารสกัดหยาบใบดาวเรือง

งานวิจัยนี้เตรียมสารสกัดจากใบดาวเรืองด้วยวิธีการหมัก (Maceration) โดยใช้ใบดาวเรืองแห้ง บดละเอียด น้ำหนักเท่ากับ 1.20 กิโลกรัม แช่ในเมทานอลปริมาตร 4 ลิตร กรองแยกกากและของเหลว ผลกรอง จากนั้นทำการระเหยเมทานอลออกได้สารสกัดหยาบเมทานอลของใบดาวเรือง น้ำหนักเท่ากับ 216.10 กรัม มีลักษณะของเหลวหนืดเกือบสีเขียวเข้ม และผลได้เป็นร้อยละ 18.00 เมื่อเปรียบเทียบกับ น้ำหนักของดอกดาวเรืองแห้ง จากนั้นทำการจัดกลุ่มสารสำคัญโดยนำสารสกัดหยาบเมทานอลมาสกัด ด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน (Solvent Partitioning Extraction) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตต และบิวทานอล ตามลำดับ และทำการระเหยตัวทำละลาย อินทรีย์ออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ได้สารสกัดหยาบ 4 ชนิดคือ สารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัด หยาบไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต และสารสกัดหยาบบิวทานอล น้ำหนักเท่ากับ 62.40, 8.04, 8.45 และ 41.72 กรัม และผลได้เป็นร้อยละ 28.87, 3.72, 3.91 และ 41.72 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) สารสกัดหยาบทั้งหมดถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ เพื่อศึกษาหาสารสกัดหยาบที่มี ประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ดีที่สุดและนำไปแยกหาสารออกฤทธิ์ในรูปสารบริสุทธิ์

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักของสารสกัดหยาบและผลได้เป็นร้อยละ

| สารสกัดหยาบ | น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม) | ผลได้เป็นร้อยละ |
|---------------|---------------------------|-----------------|
| เฮกเซน | 62.40 | 28.87 |
| ไดคลอโรมีเทน | 8.04 | 3.72 |
| เอทิล แอซิเตต | 8.45 | 3.91 |
| บิวทานอล | 41.72 | 41.72 |

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบดาวเรือง

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบดาวเรืองทดสอบฤทธิ์ต้าน เชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยการพิจารณาจากบริเวณการเกิดวงใส (Clear zone) หรือ บริเวณที่ เชื้อจุลินทรีย์ไม่เจริญเติบโต (zone of inhibition) ณ หน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อราทั้งหมด 6 ชนิดได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923, *M. luteus* ATCC 9341, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *C. albicans* ATCC 10231 โดยใช้วิธีทดสอบแบบ Disc diffusion method ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับตัวยามาตรฐาน Ampicillin ตามวิธีมาตรฐานของ ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในสภาวะแวดล้อมและสามารถก่อโรคกับมนุษย์ได้ ซึ่งแต่ละชนิดมีโทษดังนี้ *S. aureus* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบการปนเปื้อนใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารและเครื่องสำอาง ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษและโรคติดเชื้อที่ผิวหนังซึ่งอาจลุกลามเข้าสู่กระแสเลือดได้ *M. luteus* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ *B. subtilis* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้อาหารเสื่อมเสีย เช่นการเสื่อมเสียของนม อาหารกระป๋อง และยังใช้ *B. subtilis* ในการหมักอาหาร *E. coli* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร *P. aeruginosa* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์รวมทั้งคน พบได้ในดิน ผิวหนังและในสภาพแวดล้อมอื่นๆ อยู่ได้ทั่วไปในสภาพแวดล้อมปกติและสภาพออกซิเจนต่ำ ในสัตว์จะเข้าทำลายเนื้อเยื่อที่มีภูมิคุ้มกันต่ำลง และ *C. albicans* เป็นเชื้อราในกลุ่มยีสต์ชนิดหนึ่ง ซึ่งก่อให้เกิดโรคประเภชเชื้อฉวยโอกาสในคน โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคเอดส์ จากผลการทดลอง พบว่าสารสกัดหยาบไดคอลลอโรมีเทนมีผลในการยับยั้ง *M. luteus* และ *B. subtilis* โดยมีบริเวณยับยั้ง (zone of inhibition) ขนาดเท่ากับ 8 และ 9 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบไดคอลลอโรมีเทนมีผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในระดับปานกลาง สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตมีผลในการยับยั้ง *M. luteus* และ *B. subtilis* โดยมีบริเวณยับยั้งขนาดเท่ากับ 13 และ 10 มิลลิเมตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตมีผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในระดับที่ดี ส่วนสารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบบิวทานอล และสารสกัดหยาบเมทานอลไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ตารางที่ 4.2 แสดง zone of inhibition ของสารสกัดหยาบจากใบดาวเรือง

ตารางที่ 4.2 Zones of inhibition ของสารสกัดหยาบจากใบดาวเรือง

| สารสกัด | Zones of inhibition (มิลลิเมตร) | | | | | |
|----------------|---------------------------------|------------------|--------------------|----------------|----------------------|--------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>M. luteus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> |
| เฮกเซน | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ไดคอลลอโรมีเทน | 0 | 8 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| เอทิล แอซิเตต | 0 | 13 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| บิวทานอล | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| เมทานอล | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

นอกจากนี้ สารสกัดหยาบจากใบดาวเรืองถูกนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ ณ ภาควิชาโษษุ์วิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ รวมทั้งหมด 18 ชนิด เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *S. milleri* group, *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20626, *S. aureus* (MRSA) 20627, *S. aureus* (MRSA) 20633, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623, *S. aureus* (VRSA) 20683, *S. aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *B. pertussis* และ *V. cholera* และเชื้อรา ได้แก่ *C. albicans*, *C. krusei* และ *C. tropicalis* โดยใช้วิธีทดสอบแบบ Disc diffusion method เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่มนี้ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อทางช่องปาก การอักเสบของผิวหนัง ปอดบวม เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบและเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือด พบได้ที่ผิวหนัง จากการกระจายเชื้อโดยการสัมผัสและผ่านทางลมหายใจ ปัจจุบันพบว่าเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* ตื้อต่อยา Methicillin (MRSA) และ Vancomycin (VRSA) เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *B. pertussis* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคไอกรนในมนุษย์ จากการทดลองพบว่า ผลการทดสอบการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดหยาบของใบดาวเรือง 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใช้ vancomycin เป็นตัวยาเปรียบเทียบกับ สารสกัดหยาบเมทานอลแสดงการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ระดับดี 3 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20623, และ *S. aureus* (VRSA) 20683 ซึ่งมีบริเวณ

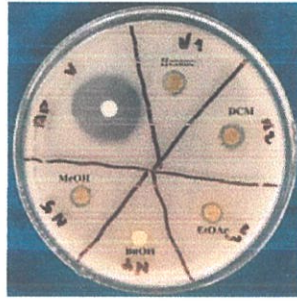
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การยับยั้ง 12-15 มิลลิเมตร แสดงการยับยั้งเล็กน้อยของ *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA), และ *S. aureus* (MRSA) 20652 8-9 มิลลิเมตร และแสดงการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 1 ชนิด คือ *B. pertussis* เมื่อนำสารสกัดหยาบเมทานอลมาสกัดแบบแบ่งส่วนพบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนแสดงการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ในระดับที่ 2 ชนิด คือ *S. aureus* (MRSA) 20636 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 มีบริเวณการยับยั้ง 15 มิลลิเมตร และยับยั้งได้เล็กน้อย 4 ชนิดคือ *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20627, *S. aureus* (MRSA) 20652 และ *S. aureus* (VRSA) 20623 มีบริเวณการยับยั้ง 8-9 มิลลิเมตร และสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *B. pertussis* ได้เล็กน้อย สารสกัดหยาบไตรคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 ได้เล็กน้อย มีบริเวณการยับยั้งประมาณ 8-10 มิลลิเมตร และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *B. pertussis* ได้เล็กน้อย มีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 9 มิลลิเมตร และสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้เล็กน้อยได้แก่ *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 มีบริเวณการยับยั้ง 8-10 มิลลิเมตร และแบคทีเรียแกรมลบคือ *B. pertussis* 8 มิลลิเมตร สำหรับสารสกัดหยาบบิวทานอลไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และสารสกัดจากใบดาวเรืองทุกชนิดไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา แสดงดังตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.1

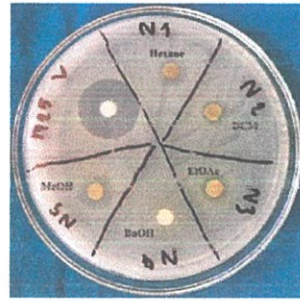
ตารางที่ 4.3 Zones of inhibition ของสารสกัดหยาบจากใบดาวเรือง

| จุลินทรีย์ | Zones of inhibition (มิลลิเมตร) | | | | |
|-------------------------------|---------------------------------|--------------|---------------|----------|---------|
| | เฮกเซน | โดคลอโรมีเทน | เอทิล แอซิเตต | บิวทานอล | เมทานอล |
| แบคทีเรียแกรมบวก | | | | | |
| <i>S. milleri</i> group | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| <i>S. pneumoniae</i> | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| <i>S. sobrinus</i> | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20625 | 8 | <8 | <8 | <8 | 8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20626 | <8 | <8 | <8 | <8 | 8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20627 | 8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20630 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20631 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20633 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20636 | 15 | 8 | 10 | <8 | 15 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20644 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20645 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20652 | 8 | <8 | <8 | <8 | 9 |
| <i>S. aureus</i> (VRSA) 20622 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (VRSA) 20623 | 9 | 8 | 8 | <8 | 12 |
| <i>S. aureus</i> (VRSA) 20683 | 15 | 10 | 8 | <8 | 15 |
| แบคทีเรียแกรมลบ | | | | | |
| <i>B. pertussis</i> | 9 | 9 | 8 | <8 | 8 |
| <i>V. cholera</i> | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| เชื้อรา | | | | | |
| <i>C. albicans</i> | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| <i>C. krusei</i> | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| <i>C. tropicalis</i> | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



B. pertussis



S. aureus (MRSA) 20625



S. aureus (MRSA) 20626



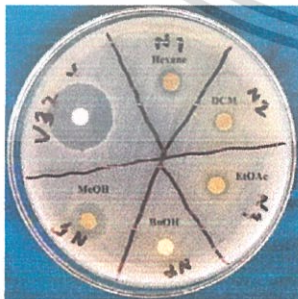
S. aureus (MRSA) 20627



S. aureus (MRSA) 20636



S. aureus (MRSA) 20652



S. aureus (VRSA) 20623



S. aureus (VRSA) 20683

ภาพที่ 4.1 Zones of inhibition ของสารสกัดจากใบดาวเรือง: N1 = เฮกเซน, N2 = ไดคลอโรมีเทน, N3 = เอทิล แอซิเตต, N4 = บิวทานอล,

N5 = เมทานอล และ V = vancomycin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการด้านเชื้อแบคทีเรียของสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบเฮกเซน

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบดาวเรือง พบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซน มีฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย การทดลองขั้นต่อไป เป็นการนำสารสกัดหยาบเฮกเซนมาแยกสารส่วนย่อยและสารออกฤทธิ์ในรูปสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี เซสารออกฤทธิ์โดยอาศัยหลักการเพิ่มขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม และจัดกลุ่มสารด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยพิจารณาจากการดูกลิ่นแสงอัตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร เปรียบเทียบความเหมือนและ/หรือต่างกันจากการเกิดสีขององค์ประกอบของสารในสารสกัดหยาบที่ปรากฏบนแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีเมื่อทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde รวมจุดสีที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน และทำการระเหยตัวทำละลายออกจาก การทดลองนำสารสกัดหยาบเฮกเซน 50.0 กรัม มาแยกสารออกฤทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยการเปลี่ยนอัตราส่วนความเข้มข้นของตัวชะสารระหว่างเฮกเซนกับเอทิล แอซิเตต และจัดกลุ่มองค์ประกอบของสารด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี สามารถแยกสารส่วนย่อยจากชั้นสารสกัดหยาบได้ทั้งหมด 6 ส่วนย่อย (H₁-H₆) อัตราส่วนระหว่างเฮกเซนและเอทิล แอซิเตต น้ำหนักของสารส่วนย่อย (H₁-H₆) และผลได้คิดเป็นร้อยละ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 การแยกสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบดาวเรือง

| สารส่วนย่อย | เปอร์เซ็นต์ของ เอทิล แอซิเตตในเฮกเซน | น้ำหนักสารส่วนย่อย (กรัม) | ผลได้เป็นร้อยละ |
|----------------|---|------------------------------|-----------------|
| H ₁ | 0-6 | 5.65 | 11.30 |
| H ₂ | 6-25 | 4.36 | 8.72 |
| H ₃ | 25-35 | 3.31 | 6.62 |
| H ₄ | 35-54 | 7.93 | 15.86 |
| H ₅ | 45-60 | 3.35 | 6.70 |
| H ₆ | 60-100 | 0.84 | 1.68 |

นำสารส่วนย่อย H₁-H₆ มาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยเทคนิค Disc diffusion method ใช้ตัวยาเปรียบเทียบกับคือ penicillin และ amoxycilline พบว่า ส่วนย่อย H₄ และ H₅ ให้ผลทดสอบที่ดีที่สุด สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกในระดับที่ตี 4 ชนิด คือ *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 มีบริเวณการยับยั้งประมาณ 14-17 มิลลิเมตร และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *B. pertussis* ได้เล็กน้อย มีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 8 มิลลิเมตร สำหรับส่วนย่อย H₃ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้เล็กน้อยได้แก่ *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 มีบริเวณการยับยั้งประมาณ 9-12 มิลลิเมตร และส่วนย่อย H₆ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้เล็กน้อยคือ *S. aureus* (MRSA) 20636 และ *S. aureus* (VRSA) 20623 มีบริเวณการยับยั้งประมาณ 10 และ 8 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และตัวอย่างบริเวณการยับยั้งของสารส่วนย่อย H₃-H₆ แสดงดังภาพที่ 4.2

ตารางที่ 4.5 Zones of inhibition ของสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบเฮกเซน

| เชื้อแบคทีเรีย | Zones of inhibition (มิลลิเมตร) | | | | | |
|-------------------------------|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | H ₁ | H ₂ | H ₃ | H ₄ | H ₅ | H ₆ |
| <i>S. pneumoniae</i> | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| <i>B. pertussis</i> | <8 | <8 | <8 | 8 | 8 | <8 |
| <i>V. cholera</i> | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20625 | <8 | <8 | <8 | 15 | 13 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20626 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20627 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20636 | <8 | <8 | 11 | 17 | 14 | 10 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20652 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (VRSA) 20622 | <8 | <8 | 10 | 14 | 13 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (VRSA) 20623 | <8 | <8 | 9 | 15 | 13 | 8 |
| <i>S. aureus</i> (VRSA) 20683 | <8 | <8 | 12 | 17 | 15 | <8 |



S. aureus (MRSA) 20625



S. aureus (VRSA) 20622



S. aureus (MRSA) 20636



S. aureus (VRSA) 20623

ภาพที่ 4.2 Zones of inhibition ของสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบเฮกเซน (H₁-H₆)

P = penicillin และ A = amoxycilline

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี disc diffusion method สารสกัดหยาบเฮกเซนและส่วนย่อย H₄ และ H₅ ได้ถูกนำมาหาค่า MIC (Minimum inhibitory concentration) โดยเลือกทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 5 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622 *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 พบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเชื้อที่มีค่า MIC เท่ากับ 5-10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ส่วนย่อย H₄ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่มีค่า MIC เท่ากับ 2.5-5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และส่วนย่อย H₅ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่มีค่า MIC เท่ากับ 2.5-10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ตัวยาเปรียบเทียบกับคือ penicillin และ amoxicillin ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ค่า MIC ของสารสกัดหยาบเฮกเซนและสารส่วนย่อย H₄ และ H₅

| เชื้อแบคทีเรีย | MIC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) | | | | |
|-------------------------------|---------------------------|----------------|----------------|------|-------|
| | สารสกัดหยาบเฮกเซน | H ₄ | H ₅ | P | A |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20625 | 10.00 | 5.00 | 5.00 | 2.50 | 1.25 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20636 | 5.00 | 2.50 | 10.00 | 2.50 | 0.625 |
| <i>S. aureus</i> (VRSA) 20622 | 5.00 | 2.50 | 2.50 | 0.15 | 0.625 |
| <i>S. aureus</i> (VRSA) 20623 | 5.00 | 2.50 | 5.00 | 5.00 | 0.625 |
| <i>S. aureus</i> (VRSA) 20683 | 5.00 | 2.50 | 2.50 | 2.50 | 0.625 |

P = penicillin, A = amoxicillin

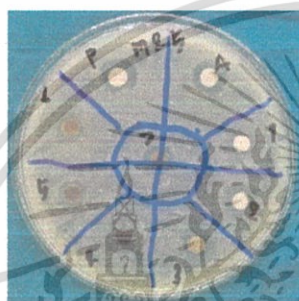
4.4 ผลการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารส่วนย่อย H₄ และ H₅ จากสารสกัดหยาบเฮกเซน

จากการทดลองพบว่า สารส่วนย่อย H₄ และ H₅ จากสารสกัดหยาบเฮกเซนสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ในระดับที่ดี จึงนำสารส่วนย่อย H₄ จากสารสกัดหยาบเฮกเซนมาแยกสารออกฤทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ทั้งหมด 7 ส่วนย่อย แล้วนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่คัดเลือกเฉพาะ 5 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 บริเวณของการยับยั้งแสดงในตารางที่ 4.7 ส่วนย่อย H₄F₁-H₄F₄ และ H₄F₆ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด โดยเฉพาะสารส่วนย่อย H₄F₄ สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* (VRSA) 20622 ได้ดีเท่ากับตัวยามาตราฐาน penicillin มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 32 มิลลิเมตร และส่วนย่อย H₄F₅ และ H₄F₇ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 4 ชนิดคือ *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 มีบริเวณยับยั้ง 8-10 มิลลิเมตร แต่ไม่แสดงการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (VRSA) 20623 (ภาพที่ 4.3)

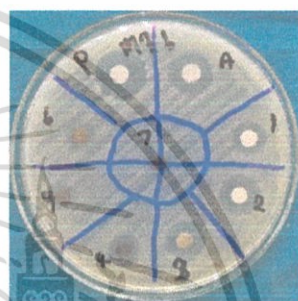
ตารางที่ 4.7 Zones of inhibition ของสารส่วนย่อยจาก H₄

| เชื้อแบคทีเรีย | Zones of inhibition (มิลลิเมตร) | | | | | | | | |
|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----|----|
| | H ₄ F ₁ | H ₄ F ₂ | H ₄ F ₃ | H ₄ F ₄ | H ₄ F ₅ | H ₄ F ₆ | H ₄ F ₇ | P | A |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20625 | 9 | 10 | 9 | 9 | 9 | 9 | 11 | 12 | 11 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20636 | 11 | 14 | 18 | 12 | 8 | 8 | 8 | 16 | 13 |
| <i>S. aureus</i> (VRSA) 20622 | 26 | 21 | 28 | 32 | 22 | 20 | 16 | 32 | 30 |
| <i>S. aureus</i> (VRSA) 20623 | 12 | 14 | 14 | 11 | <8 | 8 | <8 | 18 | 17 |
| <i>S. aureus</i> (VRSA) 20683 | 14 | 14 | 9 | 9 | 9 | 9 | 10 | 25 | 24 |

P = penicillin และ A = amoxicillin



S. aureus (MRSA) 20625



S. aureus (MRSA) 20636



S. aureus (VRSA) 20622



S. aureus (VRSA) 20623



S. aureus (VRSA) 20683

ภาพที่ 4.3 Zones of inhibition ของสารส่วนย่อย H₄F₁- H₄F₇

P = penicillin และ A = amoxicillin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำส่วนย่อย H₅ มาแยกสารออกฤทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้สารส่วนย่อยทั้งหมด 5 ส่วนย่อย แล้วนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่คัดเลือกเฉพาะ 5 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 บริเวณของการยับยั้งแสดงในตารางที่ 4.8 ส่วนย่อย H₅F₄ และ H₅F₅ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด มีบริเวณการยับยั้งตั้งแต่ 8-14 มิลลิเมตร และส่วนย่อย H₅F₂ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 2 ชนิดคือ *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 มีบริเวณการยับยั้ง 9 และ 10 มิลลิเมตร ตามลำดับ และส่วนย่อย H₅F₃ สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (VRSA) 20623 เท่ากับ 9 มิลลิเมตร ในขณะที่ส่วนย่อย H₅F₁ ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด (ภาพที่ 4.4)

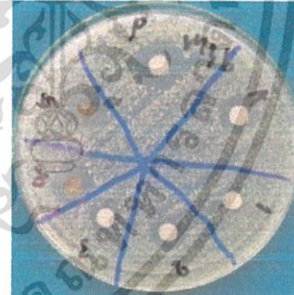
ตารางที่ 4.8 Zones of inhibition ของสารส่วนย่อย H₅

| เชื้อแบคทีเรีย | Zones of inhibition (มิลลิเมตร) | | | | | | |
|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----|----|
| | H ₅ F ₁ | H ₅ F ₂ | H ₅ F ₃ | H ₅ F ₄ | H ₅ F ₅ | P | A |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20625 | <8 | <8 | <8 | 8 | 8 | 11 | 9 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20636 | <8 | <8 | <8 | 14 | 12 | 16 | 13 |
| <i>S. aureus</i> (VRSA) 20622 | <8 | <8 | <8 | 11 | 12 | 40 | 36 |
| <i>S. aureus</i> (VRSA) 20623 | <8 | 10 | 9 | 13 | 12 | 14 | 13 |
| <i>S. aureus</i> (VRSA) 20683 | <8 | 9 | <8 | 11 | 12 | 22 | 26 |

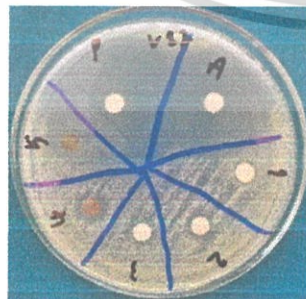
P=Penicillin และ A=Amoxycillin



S. aureus (MRSA) 20625



S. aureus (VRSA) 20636



S. aureus (VRSA) 20622



S. aureus (VRSA) 20623

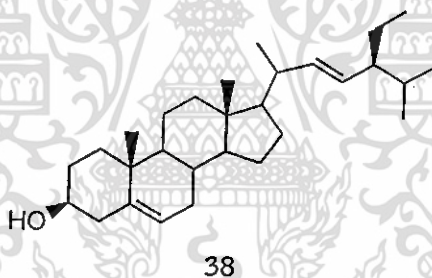
ภาพที่ 4.4 Zones of inhibition ของสารส่วนย่อย H₅F₁- H₅F₅

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกา P = penicillin และ A = amoxycilline ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

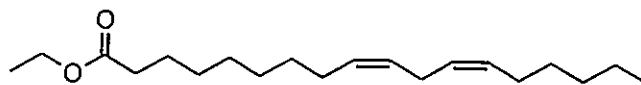
4.5 ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบดาวเรือง

4.5.1 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเฮกเซน

จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต สารสกัดหยาบบิวทานอล และสารสกัดหยาบเมทานอล ขั้นตอนต่อไปจึงนำสารสกัดหยาบเฮกเซนมาแยกองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ผลการทดลองของการแยกองค์ประกอบทางเคมีพบว่าสารสำคัญที่แยกออกมาได้เป็นสารผลิตภัณฑ์หลักและสามารถตกผลึกใหม่ได้ในปริมาณมาก มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวคือ stigmasterol 38 ซึ่งจัดเป็นไฟโตสเตอรอลหรือสเตอรอลจากพืช (Phytosterols หรือ Plant sterols) ชนิดหนึ่ง อยู่ในกลุ่มไตรเทอร์ปีน (triterpenes) เป็นสารประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ของพืชมีลักษณะคล้ายกับคลอเลสเตอรอลที่พบในสัตว์ น้ำหนักของ stigmasterol 38 เท่ากับ 1910.4 มิลลิกรัม ผลได้เป็นร้อยละ 3.06 เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักของสารสกัดหยาบเฮกเซน และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ร้อยละ 0.88 เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักสารสกัดหยาบเมทานอลที่สุญญากาศของ stigmasterol 38 ด้วยเทคนิคนิวเคลียสมกเนติกเรโซแนนซ์และเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี พบว่าสเปกตรัมของ ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของ stigmasterol 38 สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Yinusa และคณะ [22]

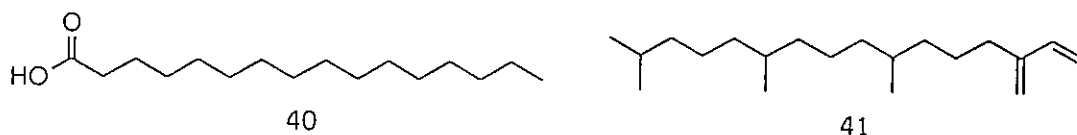


นอกจากนั้นพบว่า การแยกสารประกอบจากสารสกัดหยาบเฮกเซนทำได้ยากเนื่องจากสารประกอบมีค่า R_f (Retardation factor) ที่ใกล้เคียงกันมาก การทำให้บริสุทธิ์ทำได้ยาก และเมื่อทำการแยกสารสำคัญซ้ำหลายครั้งด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีพบว่าปริมาณสารจะลดลงอย่างมากและมีการสลายตัวของสารเกิดขึ้น ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนการวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดหยาบเฮกเซนโดยเลือกใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทเมตรี ซึ่งเป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการใช้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพวกกลุ่มสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรง, แอลกอฮอล์สายโซ่ตรง, เอสเทอร์ และน้ำมันหอมระเหย [23] จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยการคำนวณร้อยละขององค์ประกอบด้วยพื้นที่ใต้พีค FID (Flame Ionization Detector Peak) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.9 ผลการทดลองพบว่าสารประกอบหลักที่มีเปอร์เซ็นต์มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ในสารสกัดหยาบเฮกเซนได้แก่ ethyl linoleolate 39 (33.33%), palmitic acid 40 (20.32%) และ neophytadiene 41 (14.37%)



39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

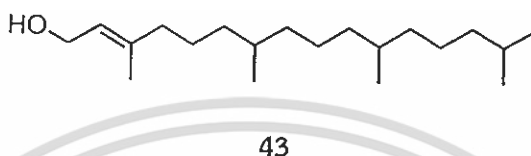
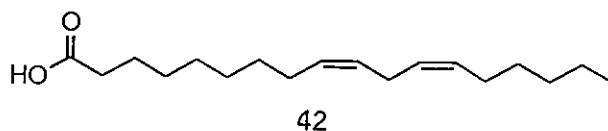


ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทเมตรีของสารสกัดหยาดเขกเซน

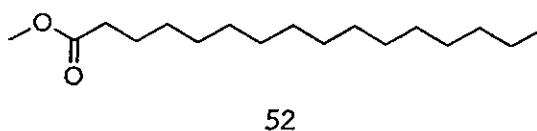
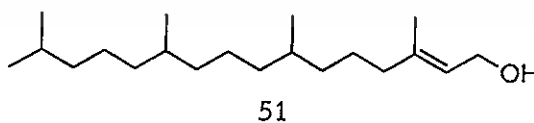
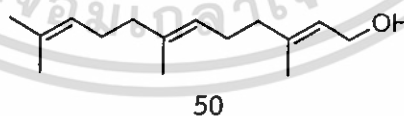
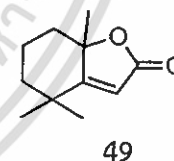
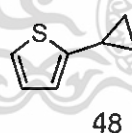
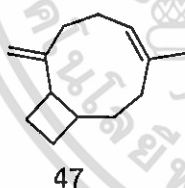
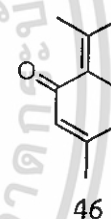
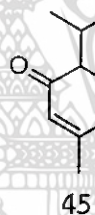
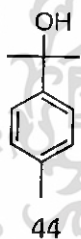
| สารประกอบ | Peak area (%) | RT (min) | Molecular Formula | MW | Fragment ion (m/z) |
|---|---------------|----------|--|-----|---|
| <i>p</i> -Cymen-8-ol 44 | 0.21 | 9.25 | C ₁₀ H ₁₄ O | 150 | 150 [M] ⁺ , 135, 105, 91, 65, 43, 32 |
| Piperitone 45 | 2.08 | 10.28 | C ₁₀ H ₁₆ O | 152 | 152 [M] ⁺ , 137, 124, 110, 95, 82, 67, 54 |
| Piperitenone 46 | 1.14 | 11.51 | C ₁₀ H ₁₄ O | 150 | 150 [M] ⁺ , 135, 121, 107, 91, 79, 67, 53, 39, 32 |
| Caryophyllene 47 | 0.18 | 12.61 | C ₁₅ H ₂₄ | 204 | 189, 161, 133, 121, 106, 93, 81, 77, 69, 55, 44, 40 |
| 2-Cyclopropylthiophene 48 | 0.23 | 12.66 | C ₇ H ₈ S | 124 | 155, 123, 109, 91, 97, 59, 43, 40, 32 |
| Dihydroactinidiolide 49 | 0.27 | 14.01 | C ₁₁ H ₁₆ O ₂ | 180 | 180 [M] ⁺ , 152, 137, 124, 111, 95, 67, 43 |
| 3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatriene 50 | 0.33 | 14.66 | C ₁₅ H ₂₆ O | 222 | 149, 121, 109, 93, 79, 73, 67, 60, 55, 41, 32 |
| Neophytadiene 41 | 14.37 | 17.43 | C ₁₅ H ₂₆ | 204 | 278 [M] ⁺ , 263, 249, 216, 222, 208, 193, 179, 165, 158, 137, 123, 109, 95, 82, 68, 57, 43, 32 |
| 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol 44 | 2.00 | 18.13 | C ₁₅ H ₂₆ O | 222 | 278, 137, 123, 109, 95, 81, 68, 57, 43, 32 |
| Methyl palmitate 45 | 1.96 | 18.83 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | 270 | 270 [M] ⁺ , 239, 227, 213, 199, 185, 171, 143, 129, 97, 87, 74, 67, 55, 43, 32 |
| Palmitic acid 40 | 20.32 | 19.44 | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 256 | 256 [M] ⁺ , 213, 185, 171, 157, 129, 115, 97, 83, 73, 60, 55, 43, 32 |
| Methyl linoleate 45 | 0.97 | 22.55 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ | 294 | 294 [M] ⁺ , 149, 135, 123, 109, 95, 81, 67, 55, 41, 32 |
| Methyl-9,12,15-octadecatrienoate 53 | 3.02 | 22.70 | C ₁₉ H ₃₂ O ₂ | 292 | 292 [M] ⁺ , 261, 236, 173, 163, 149, 135, 121, 108, 95, 79, 67, 55, 41, 32 |
| Phytol 43 | 6.36 | 22.96 | C ₂₀ H ₄₀ O | 296 | 296 [M] ⁺ , 278, 196, 165, 137, 123, 111, 95, 81, 71, 55, 43, 32 |
| Linoleic acid 42 | 7.47 | 23.37 | C ₁₈ H ₃₂ O ₂ | 280 | 280 [M] ⁺ , 182, 149, 129, 123, 109, 95, 81, 67, 55, 41, 32 |
| Ethyl linoleolate 39 | 33.33 | 23.53 | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ | 308 | 278, 149, 135, 121, 108, 95, 79, 67, 55, 41 |
| 7-hexadecyn-1-ol 46 | 1.27 | 23.99 | C ₁₆ H ₃₀ O | 238 | 284, 256, 95, 85, 79, 73, 67, 55, 41 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

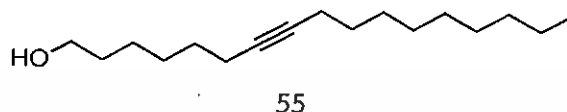
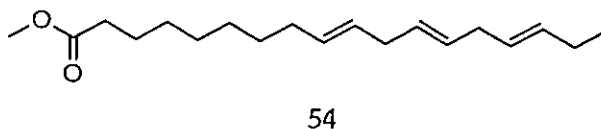
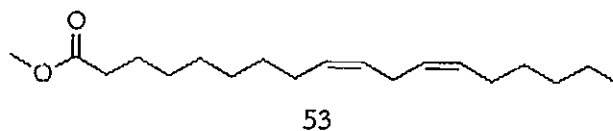
ส่วนสารประกอบที่พบในเปอร์เซ็นต์น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ได้แก่ linoleic acid 42, phytol 43, 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol 44, methyl palmitate 45 และ 7-hexadecyn-1-ol 46



และสารประกอบอื่นๆที่มีเปอร์เซ็นต์น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ได้แก่ *p*-cymen-8-ol 44, piperitone 45, piperitenone 46, caryophyllene 47, 2-cyclopropylthiophene 48, dihydroactinidiolide 49, 3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatriene-1-ol 50, 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol 51, methyl palmitate 52, methyl linoleate 53, methyl-9,12,15-octadecatrienoate 54, and 7-hexadecyn-1-ol 55.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

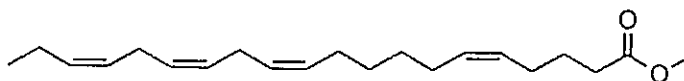


ผลการวิเคราะห์สารประกอบในสารส่วนย่อย H₄ และ H₅ ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทเมตรี แสดงดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทเมตรีของสารส่วนย่อย H₄ และ H₅

| สารประกอบ | Peak area (%) | | RT (min) | Molecular Formula | MW | Fragment ion (m/z) |
|--|----------------|----------------|----------|--|-----|---|
| | H ₄ | H ₅ | | | | |
| Dihydroactinidiolide 49 | 0.54 | 0.55 | 52.06 | C ₁₁ H ₁₆ O ₂ | 180 | 180 [M] ⁺ , 152, 137, 124, 111, 95, 67, 43 |
| Neophytadiene 41 | 0.88 | 2.14 | 17.48 | C ₂₀ H ₃₈ | 278 | 278 [M] ⁺ , 263, 249, 216, 222, 208, 193, 179, 165, 158, 137, 123, 109, 95, 82, 68, 57, 43, 32 |
| Methyl palmitate 45 | 1.12 | 0.41 | 18.83 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | 270 | 270 [M] ⁺ , 239, 227, 213, 199, 185, 171, 143, 129, 97, 87, 74, 67, 55, 43, 32 |
| Palmitic acid 40 | 17.36 | 19.30 | 19.44 | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 256 | 256 [M] ⁺ , 213, 185, 171, 157, 129, 115, 97, 83, 73, 60, 55, 43, 32 |
| Methyl (Z)-5,11,14,17-ecosatetranoate 56 | - | 44.08 | 19.64 | C ₂₁ H ₃₆ O ₂ | 320 | 278, 256, 222, 149, 135, 121, 108, 95, 79, 67, 55, 41 |
| Phytol 43 | 0.82 | 1.06 | 22.96 | C ₂₁ H ₃₆ O ₂ | 296 | 296 [M] ⁺ , 278, 196, 165, 137, 123, 111, 95, 81, 71, 55, 43, 32 |
| Linoleic acid 42 | 43.95 | 5.85 | 23.37 | C ₁₈ H ₃₂ O ₂ | 280 | 280 [M] ⁺ , 182, 149, 129, 123, 109, 95, 81, 67, 55, 41, 32 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



56

4.5.2 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบไตรโคลอโรมีเทน

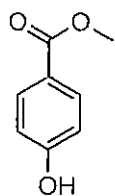
นอกจากนั้นการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบไตรโคลอโรมีเทนได้ถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทเมตรี แสดงดังตารางที่ 4.11 พบสารประกอบหลักในสารสกัดหยาบไตรโคลอโรมีเทนได้แก่ loliolide 57 (22.71%) และ syringic acid 35 (9.33%)



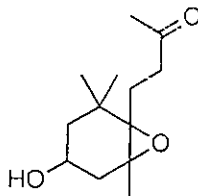
ตารางที่ 4.11 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทเมตรีของสารสกัดหยาบไตรโคลอโรมีเทน

| สารประกอบ | Peak area (%) | RT (min) | Molecular Formula | MW | Fragment ion (m/z) |
|--|---------------|----------|--|-----|--|
| Loliolide 57 | 22.71 | 16.72 | C ₁₁ H ₁₆ O ₃ | 196 | 196 [M] ⁺ , 178, 163, 155, 140, 135, 125, 111, 95, 85, 79, 67, 57, 43 |
| Syringic acid 35 | 9.33 | 17.16 | C ₉ H ₁₀ O ₅ | 198 | 198 [M] ⁺ , 183, 155, 127, 109, 93, 53, 39 |
| Methyl paraben 58 | 2.26 | 12.89 | C ₈ H ₈ O ₃ | 152 | 152 [M] ⁺ , 121, 93, 65, 39, 32 |
| 4-(hydroxyl-2,2,6-trimethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-1-yl)-3-Buten-2-one 59 | 1.46 | 14.29 | C ₁₃ H ₂₀ O ₃ | 224 | 224 [M] ⁺ , 209, 191, 149, 123, 109, 95, 43 |
| 3-(2-pentenyl)-1,2,4-cyclopentatrione 60 | 2.59 | 16.30 | C ₁₀ H ₁₂ O ₃ | 180 | 180 [M] ⁺ , 137, 109, 81, 77, 65, 55, 43, 39 |

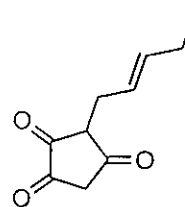
และสารประกอบที่พบในปริมาณน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ได้แก่ methyl paraben 58, 4-(hydroxyl-2, 2, 6-trimethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-1-yl)-3-Buten-2-one 59 และ 3-(2-pentenyl)-1,2,4-cyclopentatrione 60



58



59



60

4.6 ผลการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารบริสุทธิ์จากใบดาวเรือง

เนื่องจากการแยกสารประกอบจากสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบดาวเรืองด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีทำได้ยาก สารประกอบที่แยกได้ในปริมาณมากคือ stigmasterol 38 เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียพบว่าไม่ออกฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย (ภาพที่ 4.5) ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจะได้ออกฤทธิ์จากการใช้สารส่วนย่อยที่แยกได้จากสารสกัดหยาบเฮกเซนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และนำมาศึกษาชนิดของสารประกอบด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทเมตรี การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารประกอบจากใบดาวเรืองได้ถูกทดสอบกับสารบริสุทธิ์โดยใช้สารเคมีที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดโดยการเลือกทดสอบกับสารประกอบที่เป็นองค์ประกอบหลักได้แก่ palmitic acid 40, linoleic acid 42 และ caryophyllene 47 โดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 14 ชนิด แบ่งออกเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 12 ชนิด ได้แก่ *S. milleri* group, *S. pneumonia*, *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20626, *S. aureus* (MRSA) 20627, *S. aureus* (MRSA) 20630, *S. aureus* (MRSA) 20633, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด ได้แก่ *B. pertussis* และ *V. cholera* ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.11 พบว่าสารประกอบกลุ่มกรดไขมัน palmitic acid 40 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *B. pertussis* และ *V. cholera* ส่วน linoleic acid 42 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 10 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20626, *S. aureus* (MRSA) 20627, *S. aureus* (MRSA) 20630, *S. aureus* (MRSA) 20633, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 มีบริเวณการยับยั้งในช่วง 10-20 มิลลิเมตร โดยเฉพาะ *S. aureus* (MRSA) 20636 มีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 20 มิลลิเมตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *B. pertussis* เล็กน้อยโดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 8 มิลลิเมตร แต่ไม่มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *V. cholera* ตัวอย่างแสดงบริเวณยับยั้งแสดงดังภาพที่ 4.5 ส่วนสารประกอบกลุ่มน้ำมันหอมระเหย caryophyllene 47 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ยกเว้น *S. aureus* (MRSA) 20626 มีฤทธิ์ยับยั้งเพียงเล็กน้อยให้บริเวณยับยั้งเท่ากับ 8 มิลลิเมตร ซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dilika และคณะ [24] กล่าวถึงฤทธิ์การต้านแบคทีเรียแกรมบวก 5 ชนิดของ linoleic acid 42 ที่แยกได้จากใบของ *Helichrysum pedunculatum* ในประเทศแอฟริกาใต้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 Zones of inhibition ของสารประกอบจากสารสกัดเหยาบเฮกเซน

| Test microorganisms | Zones of inhibition (มิลลิเมตร) | | |
|-------------------------------|---------------------------------|---------------|---------------|
| | Palmitic acid | Linoleic acid | Caryophyllene |
| | 40 | 42 | 58 |
| <i>S. milleri</i> group | <8 | <8 | <8 |
| <i>S. pneumoniae</i> | <8 | <8 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20625 | <8 | 10 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20626 | <8 | 12 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20627 | <8 | 17 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20630 | <8 | 11 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20631 | <8 | <8 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20633 | <8 | 10 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (MRSA) 20636 | <8 | 20 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (VRSA) 20622 | <8 | 15 | <8 |
| <i>S. aureus</i> (VRSA) 20623 | <8 | 17 | 8 |
| <i>S. aureus</i> (VRSA) 20683 | <8 | 16 | <8 |
| <i>B. pertussis</i> | <8 | 8 | <8 |
| <i>V. cholera</i> | <8 | <8 | <8 |



S. aureus (MRSA) 20627



S. aureus (MRSA) 20627

ภาพที่ 4.5 Zones of inhibition ของ Stigmasterol 38 และ Linoleic acid 42

P = penicillin และ A = amoxycilline

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากดอกดาวเรือง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์และองค์ประกอบสำคัญจากใบดาวเรือง โดยนำใบดาวเรืองแห้งมาสกัดด้วยวิธีการหมักในตัวทำละลายเมทานอล เตรียมสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลได้เท่ากับ 216.10 กรัม และผลได้ร้อยละคิดเป็น 18.00 เปรียบเทียบกับน้ำหนักดอกดาวเรืองแห้ง 1.20 กิโลกรัม จากนั้นแบ่งสารสกัดหยาบเมทานอล ทำการสกัดแบบแบ่งส่วน (Solvent Partitioning Extraction) ได้สารสกัดหยาบ 4 ชนิดคือสารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต และสารสกัดบิวทานอล มีน้ำหนักเท่ากับ 62.40, 8.04, 8.45 และ 41.72 กรัม ตามลำดับ และผลได้เป็นร้อยละคิดเป็น 28.87, 3.72, 3.91 และ 41.72 ตามลำดับ

5.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบดาวเรือง

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบดาวเรือง พบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์แบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* 6 ชนิด มีบริเวณยับยั้งในช่วง 8-15 มิลลิเมตร และแบคทีเรียแกรมลบ *B. pertussis* มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 8 มิลลิเมตร และสารสกัดหยาบเมทานอลมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์แบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* 6 ชนิด มีบริเวณยับยั้งในช่วง 8-15 มิลลิเมตร และแบคทีเรียแกรมลบ *B. pertussis* มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 8 มิลลิเมตร สารสกัดหยาบจากใบดาวเรืองทุกชนิดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา

5.1.3 การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบเฮกเซน

สารสกัดหยาบเฮกเซนของใบดาวเรืองถูกนำมาแยกสารส่วนย่อยด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี สามารถแยกสารส่วนย่อยได้ 6 ส่วนย่อย (H_1-H_6) และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียพบว่าส่วนย่อย H_4 และ H_5 ให้ผลทดสอบที่ดีที่สุด สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกในระดับที่ 4 ชนิด คือ *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 มีบริเวณการยับยั้งประมาณ 14-17 มิลลิเมตร และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *B. pertussis* ได้เล็กน้อย มีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 8 มิลลิเมตร

เมื่อนำสารสกัดหยาบเฮกเซนและส่วนย่อย H_4 และ H_5 มาหาค่า MIC (Minimum inhibitory concentration) โดยเลือกทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 5 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 พบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเชื้อมีค่า MIC เท่ากับ 5-10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ส่วนย่อย H_4 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมีค่า MIC เท่ากับ 2.5-5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และส่วนย่อย H_5 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมีค่า MIC เท่ากับ 2.5-10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ตัวยาเปรียบเทียบกับคือ penicillin และ amoxicillin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.4 การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารส่วนย่อย H4 และ H5 จากสารสกัดหยาบเขกเซน

เมื่อนำสารส่วนย่อย H₄ มาแยกสารออกฤทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ทั้งหมด 7 ส่วนย่อย แล้วนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่คัดเลือกเฉพาะ 5 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 โดยเฉพาะสารส่วนย่อย H₄F₄ สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* (VRSA) 20622 ได้ดีเท่ากับตัวยามาตรฐาน penicillin มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 32 มิลลิเมตร และส่วนย่อย H₄F₅ และ H₄F₇ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 4 ชนิดคือ *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 มีบริเวณยับยั้ง 8-10 มิลลิเมตร แต่ไม่แสดงการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (VRSA) 20623

เมื่อนำส่วนย่อย H₅ มาแยกสารออกฤทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้สารส่วนย่อยทั้งหมด 5 ส่วนย่อย แล้วนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่คัดเลือกเฉพาะ 5 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 ส่วนย่อย H₅F₄ และ H₅F₅ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด มีบริเวณการยับยั้งตั้งแต่ 8-14 มิลลิเมตร และส่วนย่อย H₅F₂ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 2 ชนิดคือ *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 มีบริเวณการยับยั้ง 9 และ 10 มิลลิเมตร

5.1.5 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบดาวเรือง

องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบดาวเรืองใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทเมตรี พบว่าสารสกัดหยาบเอกเซนมีสารประกอบหลักที่มีเปอร์เซ็นต์มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ได้แก่ ethyl linoleolate 39 (33.33%), palmitic acid 40 (20.32%) และ neophytadiene 41 (14.37%) ส่วนสารประกอบที่พบในเปอร์เซ็นต์น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ได้แก่ linoleic acid 42, phytol 43, 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol 44, methyl palmitate 45 และ 7-hexadecyn-1-ol 46 และสารประกอบอื่นๆที่มีเปอร์เซ็นต์น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ได้แก่ *p*-cymen-8-ol 44, piperitone 45, piperitenone 46, caryophyllene 47, 2-cyclopropylthiophene 48, dihydroactinidiolide 49, 3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatriene-1-ol 50, 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol 51, methyl palmitate 52, methyl linoleate 53, methyl-9,12,15-octadecatrienoate 54, and 7-hexadecyn-1-ol 55 ส่วนสารที่ถูกแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้แก่ stigmasterol 38 ผลได้ร้อยละเป็น 3.06 เมื่อเทียบกับน้ำหนักของสารสกัดหยาบเอกเซน และพบว่า linoleic acid 42 เป็นสารประกอบหลักที่พบในสารส่วนย่อย H₄ และ H₅ ของสารสกัดหยาบเอกเซน

องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบโคคลอโรมีเทนได้แก่ loliolide 57 (22.71%) และ syringic acid 35 (9.33%) และสารประกอบที่พบในปริมาณน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ได้แก่ methyl paraben 58, 4-(hydroxyl-2, 2, 6-trimethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-1-yl)-3-Buten-2-one 59 และ 3-(2-pentenyl)-1,2,4-cyclopentatrione 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.6 การออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารบริสุทธิ์จากใบดาวเรือง

การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารประกอบจากใบดาวเรืองได้ถูกทดสอบกับสารบริสุทธิ์ได้แก่ palmitic acid 40, linoleic acid 42 และ caryophyllene 47 โดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 14 ชนิด แบ่งออกเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 12 ชนิด ได้แก่ *S. milleri* group, *S. pneumonia*, *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20626, *S. aureus* (MRSA) 20627, *S. aureus* (MRSA) 20630, *S. aureus* (MRSA) 20633, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด ได้แก่ *B. pertussis* และ *V. cholera* พบว่าสารประกอบกลุ่มกรดไขมัน palmitic acid 40 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *B. pertussis* และ *V. cholera* ส่วน linoleic acid 42 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 10 ชนิดได้แก่ *S. aureus* (MRSA) 20625, *S. aureus* (MRSA) 20626, *S. aureus* (MRSA) 20627, *S. aureus* (MRSA) 20630, *S. aureus* (MRSA) 20633, *S. aureus* (MRSA) 20636, *S. aureus* (VRSA) 20622, *S. aureus* (VRSA) 20623 และ *S. aureus* (VRSA) 20683 มีบริเวณการยับยั้งในช่วง 10-20 มิลลิเมตร โดยเฉพาะ *S. aureus* (MRSA) 20636 มีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 20 มิลลิเมตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *B. pertussis* เล็กน้อยโดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 8 มิลลิเมตร แต่ไม่มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *V. cholera* ส่วนสารประกอบกลุ่มน้ำมันหอมระเหย caryophyllene 47 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ยกเว้น *S. aureus* (MRSA) 20626 มีฤทธิ์ยับยั้งเพียงเล็กน้อยให้บริเวณยับยั้งเท่ากับ 8 มิลลิเมตร ผลจากการทดลองกล่าวได้ว่า linoleic acid 42 คือสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากใบดาวเรือง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim และคณะ [25] ได้กล่าวถึงฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของกรดไขมันที่มีสายโซ่เป็น long-chain unsaturated fatty acid เช่น linoleic acid 42 ถูกพบว่าเป็นสารสำคัญที่ใช้ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร

5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากใบดาวเรืองประกอบไปด้วยองค์ประกอบหลักได้แก่ สารกลุ่มกรดไขมัน และน้ำมันหอมระเหย ในงานวิจัยนี้ใช้ใบดาวเรืองแห้งในการศึกษาจึงอาจทำให้น้ำมันหอมระเหยบางชนิดสลายตัวไปกับสภาวะแวดล้อมระหว่างการสกัดหรือภายใต้สภาวะการเก็บรักษา การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารและการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ควรทดลองใช้ใบดาวเรืองสดในการสกัดสารออกฤทธิ์ อาจจะทำได้โดยการกลั่นด้วยไอน้ำและนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยทันที และควรนำใบดาวเรืองศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพทางด้านอื่นโดยยึดหลักการออกฤทธิ์ของกรดไขมันและน้ำมันหอมระเหย

บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย

สรุปรายชื่อและรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้

1. โปสเตอร์และรายงานการวิจัย:

การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 10th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. 27-30 December 2013. Harbin Institute of Technology, Harbin, P.R. China.

R. Poonrom, C. Laosinwattana, M. Teerarak and P. Charoenying. 2013. Antimicrobial Activity of Leaf extracts of *Tagetes erecta*. In Proceeding: 10th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. 27-30 December 2013. pp. 107.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



黑龙江省微生物学会
Heilongjiang Society for Microbiology



黑龙江省生物工程学会
Heilongjiang Society for Biotechnology



สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG



哈尔滨工业大学
HARBIN INSTITUTE OF TECHNOLOGY

The Proceedings of 10th ISBB

10th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology

December 27-30, 2012
Harbin Institute of Technology, Harbin, P.R.China

10th
ISBB
Harbin, China 2012

Organizer:

Heilongjiang Society for Microbiology (HSM)
Heilongjiang Society for Biotechnology (HSB)
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMUTL)
Harbin Institute of Technology (HIT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Antimicrobial activity of leaf extracts of *Tagetes erecta*

R. POONROM¹, C. LAOSINWATTANA², M. TEERARAK²
and P. CHAROENYING^{1*}

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of
Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

²Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology,
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

Abstract

Antimicrobial activity of extract and solvent-solvent partition fractions from the leaves of *Tagetes erecta* was investigated. The air-dried powdered leaves of *T. erecta* were extracted with methanol. The residue was redissolved in water which was then subjected to solvent-solvent partition with four organic solvents: hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol. Each of these extracts was tested for their antimicrobial activity against bacteria and yeast strains by disc diffusion method. The results revealed that hexane and methanol extracts showed antimicrobial activity against most of the tested microbes. These two extracts showed inhibition zones against strains of *Bordetella pertussis*, Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA), and Vancomycin Resistance *S. aureus* (VRSA). However, no antifungal activity observed against tested strains of yeasts. Extracts showed a moderate average zone of inhibition ranged from 8.00-14.00 mm. The MIC and MBC values of selected bacterial strains tested ranged from 2.5-10 mg/mL and 5-10 mg/mL. Thus, the hexane fraction was fractionated by column chromatography to obtain 6 fractions (F₁ to F₆) based on thin-layer chromatography band-pattern similarities. Each fraction was tested for their antimicrobial activity against bacteria strains. The results indicated that fractions F₄ and F₅ exhibited the greatest activity among the fractions. Further work is needed to isolate and elucidate the active compounds produced by this plant.

Keywords: *Tagetes erecta*, antimicrobial activity, inhibition zone

* Corresponding author: P. Charoenying (Email: kcpatcha@kmitl.ac.th)

บรรณานุกรม

- [1] รัฐตะวัน พุทธมัย สาวิกา หมานมา และสุภาวณี สุขโสม. 2553. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของดาวเรือง. โครงการพิเศษ สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- [2] จริยา บรอดเคลแมน เบญจมาศ ถนอมทรัพย์ เอมอร โสมนะพันธ์ และพีรพรรณ ตันอารีย์. 2532. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียของสารสกัดสมุนไพรในหลอดทดลอง. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- [3] Akanitapichat, P., A. Wangmaneerat, P. Wilairat and K. F. Bastow, 2006. Anti-herpes Virus Activity of *Dunbaria bella* Prain, *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 64-68.
- [4] Chomnawang, T. M., S. Surassmo, V. S. Nukoolkarn and W. Gritsanapan. 2005. Antimicrobial Effects of Thailand Medicinal Plants Against Acne-inducing Bacteria, *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 330-333.
- [5] Hayashi N., K. Lee, I. H. Hall, A. T. Mcphail and H. C. Huang. 1982. Structure and Stereochemistry of Levo Odorinol an Anti Leukemic Di Amide from *Aglaia odorata*, *Phytochemistry*, 21 (9), 2371-2373.
- [6] Reddy, S. V., P. V. Srinivas, B. Praveen and K. H. Kishore. 2004. Antibacterial Constituents from the Berries of *Piper nigrum*, *Phytomedicine*, 11, 697-700.
- [7] กชกร สุขจันทร์. สารเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ: สมุนไพร.
<http://www.ttmed.psu.ac.th/read.php?0>
- [8] รัตนา อินทรานุปกรณ์. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. 2547. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- [9] ลักษณะพฤกษศาสตร์ของดาวเรือง.
<http://www.nanagarden.com/ลักษณะพฤกษศาสตร์ของดาวเรือง-10143-13.html>
- [10] สารสกัดจากดอกดาวเรือง.
http://www.vistra.co.th/vistra/know_detail.php?know_id=43
- [11] S. Cetkovic, M. Djilas, M. Canadanovic-Brunet and T. Tumbas. 2004. Antioxidant Properties of Marigold Extracts. *Food Research International*, 37, pp. 643-650.
- [12] Y. Gong, X. Liu, W. He, H. Xu, F. Yuan and Y. Gao. 2012. Investigation Into the Antioxidant Activity and Chemical Composition of Alcoholic Extracts from Defatted Marigold (*Tagetes erecta* L.) Residue. *Fitoterapia*, 83, pp. 481-489.
- [13] O. Kaisoon, S. Siriamornpun, N. Weerapreeyakul and N. Meeso. 2011. Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Edible Flowers from Thailand. *Journal of Functional Foods*, 3, pp. 88-99.
- [14] S. Siriamornpun, O. Kaisoon and N. Meeso. 2012. Changes in Colour, Antioxidant Activities and Carotenoids (Lycopene, β -Carotene, Lutein) of Marigold Flower

- (*Tagetes erecta* L.) Resulting from Different Drying Processes. *Journal of Functional Foods*, 4, pp. 757-766.
- [15] M. A. Hossain, M. D. Shah, C. Gnanaraj and M. Iqbal. 2011. *In vitro* Total Phenolics, Flavonoids Contents and Antioxidant Activity of Essential Oil, Various Organic Extracts from the Leaves of Tropical Medicinal Plant *Tetragium* from Sabah. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, pp. 717-721.
- [16] M. Rondon, J. Velasco, J. Hernandez, M. Pecheneda, J. Rojas, A. Morales and J. Carmona and T Diaz. 2006. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential oil of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) Collected from the Venezuela Andes. *Revista Latinoamericana de Química*, 34/1-3, pp. 32-36.
- [17] R. Jain, N. Katare, V. Kumar, A. K. Samanta, S. Goswami and C.K. Shrotri. 2012. *In Vitro* Anti Bacterial Potential of Different Extracts of *Tagetes Erecta* and *Tagetes Patula*. *Journal of Natural Sciences Research*, vol. 2, no. 5, pp. 84-91.
- [18] M. Kiranmai and M. Ibrahim. 2012. Antibacterial Potential of Different Extracts of *Tagetes erecta* Linn. *International Journal of Pharmacy*, 2(1), pp. 90-96.
- [19] R. Raghuvver, K. Sreeja, T. Sindhuri and S. A. Kumar. 2011. Antihyperlipidemic effect of *Tagetes erecta* in Cholesterol Fed Hyperlipidemic Rats. *Der Pharmacia Lettre*, 3(5), pp. 266-270.
- [20] R. Devika and J. Koilpillai. 2012. Phytochemical Screening Studies of Bioactive Compounds of *Tagetes erecta*. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, Oct; 3(4): (B) pp. 596-602.
- [21] A. W. Bauer, W.M. Kirby, J.C. Sherris and M. Truck. 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standard Single Disk Method, *American Journal Clinical Pathology*. 45, pp. 493-496.
- [22] I. Yinusa, G. Hegbulem and O. Joseph. 2012. Isolation of Stigmasterol from Aerial Plant Part of *Spilanthes Aemella* Murr.. *World Journal of Life Sciences and Medical Research*, Vol. 2, pp. 77-81.
- [23] A. A. Kale, T. V. Gadkari, S. M. Devare, N. R. Deshpande and J. P. Salvekar. 2012. GC-MS Study of Stem Bark Extract of *Juglans regia* L., *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, Vol. 3, Issue 1, pp. 740-743.
- [24] F. Dilika, P.D. Bremner, J.J.M Meyer. 2000. Antibacterial Activity of Linoleic and Oleic acids from *Helichrysum pedunculatum*: aPlant Used During Circumcision Rites., *Fitoterapia*, Vol. 17, pp. 450-452.
- [25] C.J. Zheng, J-S. Yoo, T-G. Lee, H-Y. Cho, Y-H. Kim and W-G. Kim. 2005. Fatty Acid Synthesis is a Target for Antimicrobial Activity of Unsaturated Fatty Acids. *FEBS Letters*, 579, pp. 5157-5162.

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

| | |
|-----------|---|
| ชื่อ-สกุล | นางสาวพชนี เจริญยิ่ง |
| ตำแหน่ง | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ |
| สังกัด | สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง |

ประวัติการศึกษา

| วุฒิการศึกษา | สาขา | สถานศึกษา |
|---|---|---------------------|
| ปริญญาตรี | เคมี | มหาวิทยาลัยรามคำแหง |
| ปริญญาโท | เคมีอินทรีย์ | มหาวิทยาลัยมหิดล |
| ปริญญาเอก | เคมี (เคมีอินทรีย์) | University of York |
| สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ Honors and Awards | เคมีอินทรีย์สังเคราะห์ และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ Cerebos Award year 2003 | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้