สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบของไม้ไทย

นายวรวิทย์ วงศ์กิระปราชญ์
นางสาวสิรินทิพย์ บุดดา
นายอินทนนท์ หิรัญคำ

ฝพ.
ว28ถ
ร84ค

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 72610
วัน,เดือน,ปี 20 มิ.ย. 2550

b 11716 9993
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Antioxidant and Antibacterial activities of crude extract from Thai traditional plants

Worawit Wongkiraprat
Sirintip Budda
Intanon Hirunkham

A Special Project Submitted in Partial of the Fulfillment of the Requirement for the
Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบของไม้ไทย		
นักศึกษา	นาย วรวิทย์	วงศ์กิระปราชญ์	รหัส 46050139
	นางสาว สิรินทิพย์	บุดดา	รหัส 46050147
	นาย อินทนนท์	หิรัญคำ	รหัส 46050158
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. จิตติ ท่าไว		
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
คณะวิทยาศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง		

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ดร.จิดาภา ทินัย	
กรรมการ ดร.จิตติ ท่าไว	
กรรมการ อ.ดนึงกานต์ กลั่นบุศย์	

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบของไม้ไทย	
นักศึกษา	นาย วรวิทย์	วงศ์กิระปราชญ์
	นางสาว สิรินทิพย์	บุดดา
	นาย อินทนนท์	หิรัญคำ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	
ปีการศึกษา	2549	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. จิตติ ท่าไว	

บทคัดย่อ

ในการศึกษาค้นคว้าถึงคุณสมบัติการต้านแบคทีเรียและอนุมูลอิสระของพันธุ์ไม้พื้นบ้านไทยที่พบในเขตจังหวัดนครนายก สามชนิดคือ ผกากรอง (*Lantana camara* Linn.) สารภี (*Mammea siamensis* Kosterm.) และ เขี้ยวกระแต *Psilanthus bengalensis* (Roem.& Schult) J. Leroy.)ได้นำพันธุ์ไม้ทั้ง 3 ชนิดนำมาสกัดโดยใช้ ตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ เอทานอล และ เฮกเซน เพื่อนำมาทดสอบหาฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย 6 ประเภท *Escherichia coli* ATTC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยใช้วิธี agar disc diffusion ผลจากการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนของผกากรอง และสารภีสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Micrococcus luteus* ในขณะที่ สารสกัดหยาบของเขี้ยวกระแตมีฤทธิ์ต่ำในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*

ในการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระใช้การทดสอบเบื้องต้นโดย TLC Screening Assay และประเมินผลโดยการใช้ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging ผลที่ได้พบว่าสารสกัดหยาบผกากรอง เขี้ยวกระแต และ สารภี แสดงความสามารถในการลดปริมาณของอนุมูลอิสระ (DPPH) นอกจากนี้สารสกัดหยาบของสารภีในชั้นเฮกเซนแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $5x10^{-10}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดหยาบของผกากรองในชั้นเอทานอลและเฮกเซนแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $5x10^{-8}$ และ $2.75x10^{-5}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Antioxidant and antibacterial activities from crude extract of Thai traditional plants

Name Mr. Worawit Wongkiraprach

Miss. Sirinthip Budda

Mr. Inthanon Hirunkham

Department Applied biology

Program Biotechnology

Academic Year 2006

Special Project Advisor Dr. Chitti Thawai

Abstract

Screening for antibacterial and antioxidant activities from three Thai traditional plants that collected from Nakhon Nayok, *Lantana camara* Linn., *Mammea siamensis* Kosterm. and *Psilanthus bengalensis* (Roem.& Schult) J. Leroy .were studied

The plants were extracted with two organic solvents,ethanol and hexane.The crude extracts were tested for antibacterial activity against six genera of tested microorganisms, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Candida albicans* ATCC 10231, using agar disc diffusion method.The results showed that the crude hexane extracts of *Lantana camara* Linn., *Mammea siamensis* Kosterm. inhibited the growth of gram positive bacteria such as *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. In the other hand, the crude ethanolic extract of *Psilanthus bengalensis* (Roem.& Schult) J. Leroy showed weakly antibacterial activity against gram negative bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*

The antioxidant activity was preliminary tested by using TLC Screening Assay and then evaluated by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging method.The results revealed that the crude extract from *Lantana camara* Linn., *Mammea siamensis* Kosterm and *Psilanthus bengalensis* (Roem.& Schult) J. Leroy exhibited the ability to reduce DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl).Furthermore the crude hexane extract of *Mammea siamensis* Kosterm. exhibited the best antioxidant activity with the IC_{50} (inhibition concentration)at $5x10^{-10}$ mg/mL. Followed by the crude ethanolic and hexane extracts of *Lantana camara* Linn. The antioxidant activity with the IC_{50} at $5x10^{-8}$ mg/ml and $2.75x10^{-5}$ mg/mL, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงงานพิเศษ ในหัวข้อเรื่องการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบจากไม้ไทย โครงงานพิเศษนี้จะไม่สามารถบรรลุจุดประสงค์ไปได้ด้วยดีหากไม่ได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.จิตติ ท่าไว ที่ให้คำปรึกษา ความรู้ต่างๆ เกี่ยวกับการทดลอง ข้อเสนอแนะ การตอบข้อซักถามของผู้จัดทำ และข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในการทดลอง " ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบจากไม้ไทย "(Antioxidant and Antibacterial activities of crude extract from Thai traditional plants) จนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ทางผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ อ.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ และ ดร.จิดาภา ทิน้อย ที่ให้คำแนะนำปรึกษาและกรุณาช่วยตรวจแก้ไขงานวิจัยนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องต่าง ๆ ในการทำการทดลอง

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาให้ใช้สถานที่เพื่อปฏิบัติงานวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาของผู้จัดทำที่เป็นกำลังใจและให้คำปรึกษาในการทำโครงงานพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในเรื่องต่างๆ ทำให้โครงงานพิเศษเป็นไปด้วยดี

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใดผู้จัดทำขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

นายวรวิทย์ วงศ์กิระปราชญ์
นางสาวสิรินทิพย์ บุดดา
นายอินทนนท์ หิรัญคำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่1 บทนำ	1
บทที่2 ทฤษฎีและหลักการ	4
บทที่3 วิธีการดำเนินการ	28
บทที่4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	34
บทที่5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	50
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก ก.	54
ภาคผนวก ข.	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ (free radicals) และ Reactive oxygen species (ROS)	10
2 แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากสิ่งสกัดหยาบของผกากรอง	35
3 แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากสิ่งสกัดหยาบของสารภี	38
4 แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากสิ่งสกัดหยาบของเขี้ยวกระแต	41
5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบจากสารภี	46
6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบจากผกากรอง	47
7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบจากเขี้ยวกระแต	48
8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของ Quercetin	49
9 ค่า IC_{50} ของ สารสกัดส่วนของเฮกเซน และ ส่วนของเอทานอล ของ สารภี ผกากรอง และ เขี้ยวกระแต	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อยู่ในเขตร้อน (Tropic zone) อุดมไปด้วยพันธุ์ไม้นานาชนิด ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ เหมาะสมเป็นอย่างยิ่งที่จะได้ทำการศึกษาหาสารสกัดจากพืชเหล่านี้เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านต่าง ๆ

ตั้งแต่โบราณกาลคนไทยมีการนำพืชมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายยกตัวอย่าง เช่น ใช้เป็นอาหาร ผลิตภัณฑ์เครื่องนุ่งห่ม และที่สำคัญที่สุดคือนำมาใช้เป็นยารักษาโรค จนกระทั่งถึงปัจจุบันการนำพืชสมุนไพรมาใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพก็ยังคงได้รับความนิยม อันสังเกตเห็นได้จากการนำพืชสมุนไพรมาใช้ในสถานพยาบาลแผนไทย นำมาใช้เป็นส่วนผสมของเครื่อง สำอาง การนำพืชสมุนไพรมาใช้เป็นยารักษาโรค หรือแม้แต่ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำพืชสมุนไพรมาสกัดและนำสาระสำคัญที่ออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพรมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ อย่างกว้างขวางยกตัวอย่าง เช่น การนำสารสกัดจากขมิ้นมาใช้ในยารักษาโรคและส่วนผสมในเครื่องสำอางเพื่อช่วยในการชะลออายุของผิว เป็นต้น (http://www.samunpri.com)

จากการที่ได้มีการนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรมาใช้เป็นยารักษาโรคและส่วนผสมในเครื่องสำอาง จึงมีความสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะทำการศึกษาพืชชนิดใหม่ ๆ เพื่อหาสารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอาจนำมาใช้เป็นตัวยาที่สำคัญในการรักษาโรคหรือเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง เป็นอาหารเพื่อเสริมสุขภาพ โดยการศึกษาครั้งนี้จะมุ่งเน้นไปที่สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ด้านสารอนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาบของไม้ไทย

อนุมูลอิสระ (Free radical) เป็นส่วนของโมเลกุลที่มีพลังงานสูง ไม่เสถียรเนื่องจากขาดอิเล็กตรอนไป 1 ตัว ปกติแร่ธาตุทั้งหลายในร่างกายของเราจะมีอิเล็กตรอนอยู่วงรอบเป็นจำนวนคู่ ซึ่งทำให้โมเลกุลนั้นคงตัว ในกรณีที่มีการสูญเสียอิเล็กตรอน หรือรับอิเล็กตรอนมาอีกเพียง 1 ตัวจะทำให้โมเลกุลนั้นไม่มั่นคงกลายเป็นตัวอันตราย เนื่องจากเมื่อเจอโมเลกุลอื่น ๆ จะแย่งอิเลกตรอนมาจากโมเลกุลนั้น 1 ตัว ตัวที่ถูกแย่งอิเล็กตรอนก็จะกลายเป็นตัวที่ไม่มั่นคงต้องไปแย่งเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงต่อ ๆ กันไป กลายเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (oxidative chain reaction) การเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้ โดยปกติแล้วอนุมูลอิสระนั้นจะเกิดขึ้นในร่างกายอยู่ตลอดเวลา จากกระบวนการหายใจ การเผาผลาญสารต่าง ๆ ในร่างกาย นอกจากนี้แล้ว สิ่งแวดล้อมยังเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ซึ่งโดยปกติแล้วร่างกายจะสามารถสร้างสารต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระได้ แต่ถ้ามีอนุมูลอิสระมากเกินไปร่างกายไม่สามารถกำจัดได้หมด ทำให้จำเป็นต้องเสริมสร้างสารต่อต้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุมูลอิสระจากแหล่งอื่น ๆ เข้าไปเพื่อช่วยในการกำจัดอนุมูลอิสระให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระจะทำหน้าที่ จับกับอนุมูลอิสระแล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย (http://www.thaiclinic.com)

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวขนาดเล็ก ซึ่งบางชนิดเป็นสาเหตุสำคัญในการก่อโรคในมนุษย์ ดังนั้นการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียนับเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยบรรเทาอาการเจ็บป่วยที่เกิดขึ้น ดังนั้นในการศึกษาสารสกัดชนิดใหม่ ๆ ที่ได้จากพืชจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เพื่อที่จะแสวงหาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ เพื่อเพิ่มทางเลือกในการพัฒนานำมาใช้เป็นยารักษาโรคต่อไป

ไม้ไทยที่นำมาใช้ในการศึกษานี้เป็นพืชที่สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทย บางชนิดมีประวัติว่าคนโบราณนำมาใช้เป็นยารักษาโรค พืชที่นำมาศึกษา ได้แก่ ผกากรอง สารภีและเขี้ยวกระแต

เนื่องด้วยไม้ไทยทั้ง 3 ชนิด สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทย และส่วนใหญ่ชาวบ้านได้นำส่วนต่าง ๆ มาใช้เป็นยารักษาโรคบรรเทาความเจ็บป่วยภายในครัวเรือน นับว่าเป็นภูมิปัญญาชาวบ้านของคนไทยที่มีมาแต่โบราณกาล แต่ยังไม่ได้รับการศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์อย่างจริงจัง ดังนั้นจึงเลือกไม้ไทยทั้ง 3 ชนิดนี้มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่การศึกษา อาจจะทำให้ค้นพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าไม้ไทยที่ใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรคกันอยู่ในปัจจุบัน และเพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการ ค้นคว้า และ พัฒนา ผลิตภัณฑ์ยา และเครื่องสำอาง จากพืชสมุนไพรไทยต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 ทำการสกัดสารจากไม้ไทย

1.2.2 ทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากสิ่งสกัดหยาบของไม้ไทย

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1.3.1 ทำการสกัดสารจากไม้ไทย

1.3.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถแยกสิ่งสกัดหยาบ ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสิ่งสกัดหยาบนั้นได้

1.4.2 เพื่อรวบรวมเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านการศึกษาสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบของไม้ไทย

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1.5.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากไม้ไทย

1.5.1.1 การเตรียมตัวอย่างไม้ไทย ได้แก่ ผลากรอง สารภี เขี้ยวกระแต

1.5.1.2 การนำตัวอย่างไม้ไทยมาอบแห้งและบดให้เป็นผง

1.5.1.3 การสกัดสารจากตัวอย่างไม้ไทยโดยใช้เอทานอลร้อยละ 95

1.5.1.4 การทำให้สารสกัดหยาดเข้มข้นโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (Rotary evaporator)

1.5.2 การทดสอบสาระสำคัญทางพฤกษาเคมีเบื้องต้น

1.5.2.1 การทดสอบโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี หรือรงค์วัตถุผิวบาง (Thin Layer Chromatography, TLC)

1.5.2.2 ตรวจหาสารประกอบหลัก (Major compound) ของสารสกัด

1.5.3 ศึกษาสารที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากไม้ไทยแต่ละชนิด

1.5.3.1 การเตรียมสารดักจับอนุมูลอิสระ DPPH

1.5.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.5.4 ศึกษาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากไม้ไทยแต่ละชนิด

1.5.4.1 การเตรียมสารสกัด

1.5.4.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.5.4.3 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่จะใช้ทดสอบ

1.5.4.4 ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Agar Disc Diffusion method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 สมุนไพร

สมุนไพร (Medicinal plants) ตามความหมายในพจนานุกรม ฉบับราชบัณฑิตยสถานได้ให้คำจำกัดความของคำว่า สมุนไพร หมายถึง พืชที่ใช้ทำยาเป็นเครื่องยา ซึ่งหาได้ตามพื้นเมืองมิใช่เครื่องเทศ ส่วนพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2522 และความหมายในตำรายาไทยให้ความหมายของยาสมุนไพรแตกต่างออกไปเล็กน้อย โดยยาสมุนไพรจะหมายถึงยาที่ได้จากพฤกษชาติ สัตว์ หรือแร่ซึ่งมิได้ผสมปรุงหรือแปรสภาพ เช่น พืชก็ยังคงสภาพเป็นส่วนราก ลำต้น ใบ ดอก หรือผลอยู่ยังไม่ได้ผ่านขั้นตอนการแปรรูปใด ๆ ทั้งสิ้น แต่ความเป็นจริงแล้วในทางการค้าสมุนไพรมักจะถูกดัดแปลงไปเป็นรูปแบบที่แตกต่างกัน อาทิเช่น ตัดแบ่งให้เป็นส่วน ๆ ที่เล็กลงบดเป็นผงอัดเม็ด เป็นแคปซูล เป็นต้น (http://www.samunpri.com)

2.1.1 ตัวยาสำคัญในพืชสมุนไพร

สรรพคุณของพืชสมุนไพรขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณสาระสำคัญซึ่งเป็นสารประกอบเคมีที่มีอยู่ในพืช โดยปริมาณสารจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับพันธุ์พืช สิ่งแวดล้อมที่ปลูกตลอดจนช่วงเวลาที่เก็บเกี่ยวสมุนไพร สารประกอบเคมีที่พบในพืชในพืชสมุนไพรจำแนกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

2.1.1.1 สารปฐมภูมิ (primary metabolite)

สารกลุ่มนี้จัดเป็นสารที่มีบทบาทในขบวนการเมตาบอลิซึมหลักทั่ว ๆ ไปของพืช พบในพืชทุกชนิด มักเป็นสารผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหลักในพืช เช่น กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง กระบวนการสังเคราะห์ไขมัน การสังเคราะห์โปรตีน การสังเคราะห์สารสี จะได้คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน และสารสีตามลำดับ สารเหล่านี้จัดเป็นสารปฐมภูมิของพืช

2.1.1.2 สารทุติยภูมิ (secondary metabolite)

เป็นสารที่พืชสังเคราะห์ขึ้นแตกต่างไปจากสารปฐมภูมิ โดยอาจจะเกิดกระบวน การชีวสังเคราะห์ (biosynthesis)ในพืชต่างชนิดกันจะพบสารที่แตกต่างกัน เช่น พบสารอัลลิซิน (allicin) ในกระเทียม แต่พบคาเฟอีน (caffeine) ในกาแฟ เป็นต้น สารประกอบเคมีในกลุ่มนี้ได้แก่ สารในกลุ่มทุติยภูมิ ซึ่งจะกล่าวถึงสาระสำคัญบางชนิดดังนี้

2.1.1.2.1 น้ำมันหอมระเหย (essential oil)

จัดเป็นสารทุติยภูมิที่พบในพืชหลายชนิด คุณสมบัติโดยทั่วไปมีกลิ่นเฉพาะตัว ระเหยง่ายที่อุณหภูมิปกติ เบากว่าน้ำ พบมากในพืชสมุนไพรที่เป็นเครื่องเทศแยกออกมาได้โดยการกลั่นไอน้ำ ในน้ำมันอาจมีส่วนผสมของสารเคมีหลายชนิด สรรพคุณทางยามักใช้เป็นยาขับลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และฆ่าเชื้อโรค ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ให้น้ำมันหอมระเหย ได้แก่ กระเทียม ขิง ข่า ไพล และขมิ้น เป็นต้น

2.1.1.2.2 แอลคาลอยด์ (alkaloid)

เป็นสารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นด่าง ซึ่งมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ มีรสขม ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ แต่ถ้าอยู่ในสารประกอบของเกลืออาจจะละลายน้ำได้ สารในกลุ่มแอลคาลอยด์มีผลทางยาต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกายหลายระบบ เช่น อะไทรพีน (atropine) จากต้นลำโพงมีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ จึงใช้ผสมในยาแก้ปวดท้องสารรีเซอร์พีน (reserpine) ในรากกระย่อมมีสรรพคุณลดความดันโลหิต สารควินิน (quinine) ในเปลือกต้นซิงโคนามีสรรพคุณในการรักษาโรคมาลาเรีย เป็นต้น

2.1.1.2.3 ไกลโคไซด์ (glycoside)

เป็นสารประกอบอีกกลุ่มหนึ่งที่พบมากในพืชสมุนไพรนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง ในสูตรโครงสร้างของสารจะมีส่วนสำคัญสองส่วน คือ ส่วนที่เป็นน้ำตาลและส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล (เรียกว่า aglycone) ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทำให้แบ่งไกลโคไซด์ออกได้หลายประเภทดังนี้

- ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) พบเป็นสารสีในส่วนต่าง ๆ ของพืชมีหลายชนิด เช่น ในดอกไม้สีเหลืองจะพบฟลาโวน (flavones) ฟลาโวนอล (flavonol) แต่ในดอกไม้สีแดง ม่วง น้ำเงิน จะเป็นสารพวกแอนโธไซยานิน (anthocyanins)

- ซาโปนินไกลโคไซด์ (saponin glycosides) สารนี้เมื่อเขย่ากับน้ำจะเกิดฟองจึงใช้ลดแรงตึงผิวได้ดีและทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ สารกลุ่มนี้ใช้ประโยชน์ได้หลายประการ คือ ใช้ชะล้างแทนสบู่ ใช้เป็นยาเบื่อปลา ประโยชน์สำคัญในวงการเภสัช คือ ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสเตอรอยด์ (steroids) พืชสมุนไพรที่ให้สารกลุ่มนี้ ได้แก่ พืชจำพวกกลอย มีสารไดออสจินิน (diosgenin)

- คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycoside) สารกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ต่อระบบกล้ามเนื้อหัวใจและระบบการไหลเวียนโลหิต ตัวอย่างเช่น พืชในวงศ์อะโพไซเนซีอี (Apocynaceae) หลายชนิดให้สารกลุ่มนี้ได้แก่ ยี่โถ (*Nerium indicum* Mill.) ให้สาร Oleandroside และ Nerioside สารเหล่านี้เป็นสารที่ออกฤทธิ์ต่อหัวใจทั้งสิ้น

- แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (anthraquinone glycosides) สารกลุ่มนี้ออกฤทธิ์เป็นยาระบาย (laxative) ยาฆ่าเชื้อ (antibiotic) และสีย้อม พืชสมุนไพรที่ให้สารเคมีในกลุ่มนี้ได้แก่ มะขามแขก โกศน้ำเต้า คูณ ขี้เหล็ก ชุมเห็ด และว่านหางจระเข้ เป็นต้น

- ไซยาโนจินีติกไกลโคไซด์ (cyanogenetic glycosides) สารกลุ่มนี้สลายให้สารพิษจำพวกไซยาไนด์ พืชกลุ่มนี้ถ้าจะนำมาเป็นอาหารต้องทำให้สุกก่อนจะด้วยวิธีการเผา ต้ม หรือย่าง เพื่อให้สารไซยาไนด์สลายตัวก่อน ถ้าสัตว์กินพืชที่มีสารพวกนี้อยู่อาจจะทำให้สัตว์ตายได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชที่ให้สารกลุ่มนี้ ได้แก่ มันสำปะหลัง ลูกกระ ต้นตำแยแมว ผักเสี้ยนผี ใบยางพารา ชะอม หญ้าตีนกา และฝักสะตอ

- แลคโทนไกลโคไซด์ (lactone glycosides) สารเคมีกลุ่มนี้บางชนิดมีกลิ่นหอม ได้แก่ คูมาริน (coumarin) จากเปลือกต้นชะลูด ใช้เป็นสารแต่งกลิ่นหอมในเครื่องสำอางเป็นส่วนผสมในครีมป้องกันการแพ้แสงแดดหรือผสมในแป้งฝุ่นทาตัว

2.1.1.2.4 แทนนิน (tannin)

สารแทนนินพบในพืชทั่วๆไป มีรสฝาดมีฤทธิ์เป็นกรดอ่อนและสามารถตกตะกอนโปรตีนได้ เมื่อถูกกับเกลือคลอไรด์ของเหล็กจะให้สีเขียว สรรพคุณทางยามีฤทธิ์ฝาดสมานฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ใช้บรรเทาอาการท้องร่วงได้ พบในใบฝรั่ง เนื้อผล และกล้วยน้ำว้า

2.1.1.2.5 กัม (gum)

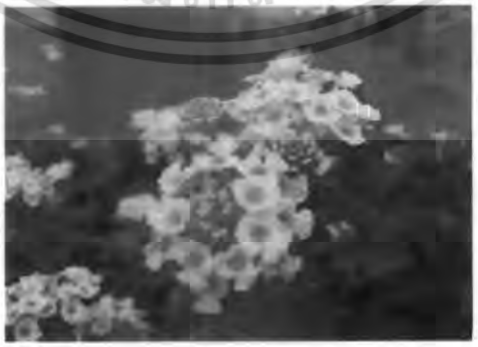
เป็นสารที่พืชบางชนิดขับออกมา เมื่อพืชได้รับบาดแผล ลักษณะเป็นสารเหนียว บางชนิดมีสรรพคุณทางยา

2.1.1.2.6 ลาเทกซ์ (latex)

สารที่มีลักษณะคล้ายน้ำยางสีขาวข้น ประกอบด้วยสารจำพวกแป้ง กัม เรซิน (resin) อาจมีสารอ่อนอยู่บ้าง สารกลุ่มนี้บางตัวเมื่อรวมกับสารบางอย่างเป็นสาเหตุร่วมของการก่อมะเร็ง (co-carcinogen) ซึ่งเรียกว่า โฟร์บอล (phorbol)

การศึกษาเพื่อให้ทราบถึงคุณสมบัติสาระสำคัญชนิดต่าง ๆ ในพืชจะทำให้เข้าใจถึงการออกฤทธิ์ ประโยชน์และโทษของพืชสมุนไพรแต่ละชนิด ซึ่งเป็นแนวทางการนำสมุนไพรไปใช้บำบัดรักษาได้อย่างถูกต้องปลอดภัยหรือหลีกเลี่ยงพิษและอันตรายที่เกิดจากความไม่รู้ได้ (วีณา ,2536)

2.2 สมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง



รูปที่ 1 ผกากรอง

ที่มา : http://th.wikipedia.org

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 ผกากรอง

ชื่อวงศ์ Verbenaceae

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Lantana camara* Linn.

ชื่อสามัญ Lantana, Wild sage, Cloth of gold

ลักษณะทางพฤษศาสตร์ ผกากรองเป็นไม้ดอกอายุหลายปี ตามลำต้นมีขนปกคลุม แตกกิ่งก้านสาขาออกรอบๆ ต้น ใบเป็นรูปไข่ ขอบใบจัก ปลายใบแหลม ใบออกเป็นคู่ ๆ สลับกัน สีเขียวเข้ม ดอกออกเป็นช่อบริเวณส่วนยอดของกิ่งก้าน มีหลายสี ทั้งสีเดียวและสีผสม ขนาดดอกเล็ก การปลูกและดูแลรักษา ผกากรองเป็นไม้กลางแจ้ง ชอบแสงแดดจัด ดินที่ปลูกควรเป็นดินร่วนซุยหรือดินปนทราย (http ://www.childthai.org)

การขยายพันธุ์ โดยการเพาะเมล็ดและปักชำ (ส่วนใหญ่แล้วนิยมการปักชำเพราะสะดวกและรวดเร็วกว่า)

ประโยชน์ทางสมุนไพร

ต้น	ใช้เป็นยาแก้ไข้ รักษาไขข้ออักเสบ
ราก	ใช้เป็นยากลั้วคอ แก้ปวดฟัน
ใบ	ใช้ตำพอกแผล ฝีพุพอง
ดอก	ใช้ห้ามเลือด รักษาอาการปวดท้อง อาเจียน

รูปที่ 2 ต้นสารภี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 สารภี

ชื่อวงศ์ Guttiferae

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Mammea siamensis* Kosterm.

ลักษณะทางพฤษศาสตร์ สารภีเป็นไม้ป่าของไทย มักขึ้นตามป่าดงดิบและป่าเบญจพรรณทั่วทุกภาคในประเทศไทย เป็นต้นไม้ที่มีค่าทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง สารภีเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ไม่ผลัดใบ มีใบแน่นเป็นพุ่มหนาทึบและมีกิ่งก้านสาขามาก ขนาดต้นสูงประมาณ 12 -15 เมตร ใบเรียบเกลี้ยงรูปไข่ ปลายใบกว้างกว่าโคนใบยาว 5 - 6 นิ้ว มีดอกสีขาวกลิ่นหอมแรงและไปได้ไกล ออกดอกเป็นช่อ ดอกเรียงแน่นเป็นกระจุกตามซอกกิ่ง ขนาดดอกกว้างประมาณ 2 ซม. มีกลีบดอก 5 กลีบ กับเกสรตัวผู้เป็นเส้นฝอยสีเหลืองล้อมอยู่ในวงใน เริ่มออกดอกในเดือนมกราคมและจะบานสะพรั่งเต็มที่ในเดือนกุมภาพันธ์ (http://www.panmai.com)

การขยายพันธุ์ โดยการเพาะเมล็ดและตอนกิ่ง สารภีเป็นพันธุ์ไม้ที่สามารถปลูกได้ทั้งที่แจ้งและแดดร่มรำไร สามารถขึ้นได้ในดินทุกชนิด แต่ควรมีความชื้นเพียงพอ

ประโยชน์ทางสมุนไพร ดอกสดและแห้ง บำรุงหัวใจ บำรุงประสาทแก้วิงเวียนและพบว่าสารสกัดของดอกสารภีด้วยคลอโรฟอร์ม มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิด *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* โดยมีระยะการยับยั้งการเจริญเติบโตเป็น 7.8 และ 9.0 มม. ตามลำดับ สารสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติมโตเฉพาะเชื้อ *B.subtilis* สารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเอทานอลไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ DPPH (Subhadhirasakul, 2005)

รูปที่ 3 เขี้ยวกระแต

ที่มา : http://rspg.thaigov.net

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 เขี้ยวกระแต

ชื่อวงศ์ Rubiaceae

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Psilanthus bengalensis* (Roem.& Schult) J. Leroy

ลักษณะทางพฤษศาสตร์ เป็นไม้พุ่มเตี้ยสูงประมาณ 1 เมตร แตกกิ่งจำนวนมาก ที่ใกล้พื้นดิน ลำต้นและกิ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 - 0.4 เซนติเมตร กิ่งกรอบหักง่าย ใบ เป็นใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม เป็นคู่ใบรูปไข่ กว้าง 3 - 5 เซนติเมตร ยาว 5 - 8 เซนติเมตร ปลายใบแหลมโคนใบสอบ ใบสีเขียวเข้มเป็นมันก้านใบยาว 0.8เซนติเมตร ดอกเดี่ยวมีสีขาว ออกตามซอกใบและปลายกิ่ง กลีบเลี้ยงสีเขียวรูปถ้วย โคนกลีบดอกเชื่อมกันเป็นหลอดสีขาวยาว 1 - 2เซนติเมตร ปลายแยกเป็น 4 กลีบ แต่ละกลีบกว้าง 0.2 - 0.3 เซนติเมตร ยาว 1.5 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางดอก 3 - 3.5 เซนติเมตร ดอกบานและส่งกลิ่นหอมแรงในช่วงกลางคืน หอมอ่อนในเวลากลางวัน ออกดอกตลอดปี แต่ดอกดกในช่วง กุมภาพันธ์

การขยายพันธุ์ ขยายพันธุ์โดยการปักชำและตอนกิ่ง การตอนกิ่งโดยวิธีดวั่นจะหักง่าย เนื่องจากกิ่งเล็กและเปราะต้องควรมัดกิ่งกับหลัก หรือผูกโยงด้วยเชือกกันกิ่งหัก การตอนกิ่งโดยวิธีปาดหรือกรีด ให้เป็นแผลยาวจะให้ผลดีขึ้น ส่วนการปักชำควรใช้กิ่งที่ยางประมาณ 10 - 15 เซนติเมตร ปักชำในทรายผสมขี้เถ้าแกลบและวางกระบะปักชำในกระโจม พบว่าออกรากได้ดีขึ้น เหมาะที่จะปลูกลงกระถางหรือลงแปลงในที่ร่มรำไร (http://www.thaigoodview.com)

ประโยชน์ทางสมุนไพร ไม่พบประโยชน์ทางสมุนไพร

2.3 สารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant)

อนุมูลอิสระ (free radicals) หรือ ROS คือโมเลกุลหรืออิออนที่มีอิเลคตรอนโดดเดี่ยว อยู่รอบนอกและมีอายุสั้นมากประมาณ 1 หรือ 10^{-3}-10^{-10} วินาที จึงจัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี โดยสามารถตรวจวัด ด้วย Electron Spin Resonance (ESR) โมเลกุลหรืออิออนชนิดนี้เป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ และ Reactive oxygen species (ROS) ดังตารางที่ 1 (Aksaranugraha S. , 2003)

โดยปกติจะมีการกล่าวถึงเฉพาะอนุมูลอิสระ (free radicals) ที่เป็นสาเหตุการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายเรา แต่ Reactive oxygen species (ROS) เป็นสารสำคัญสารหนึ่งโดย ROS จะรวมถึงโมเลกุลที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาที่เป็นทั้ง อนุมูลอิสระ (radicals) หรือที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ (non radicals) (Aksaranugraha ., 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ (free radicals) และ Reactive oxygen species (ROS)

สารอนุมูลอิสระ	สูตรโมเลกุล
Superoxide anion radical	$O^{\cdot}_2$
Hydroxyl radical	$HO^{\cdot}$
Peroxide radical	$ROO^{\cdot}$
Peroxyl radical	$LOO^{\cdot}$
Hydrogen peroxide	H_2O_2
Ozone	O_3
Singlet oxygen	$^1O_2$
Hydrogen radical	$H^{\cdot}$
Methyl radical	$CH^{\cdot}_3$

2.3.1 อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย

ในร่างกายมีแหล่งต่าง ๆ ภายในเซลล์ที่สามารถสร้างหรือปลดปล่อย oxygen free radical โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากปฏิกิริยาปกติที่เกิดขึ้นในร่างกาย เช่น mitrochondrial electron transport chain ขณะที่ปฏิกิริยาเหล่านี้ดำเนินไปอย่างต่อเนื่อง อาจมี oxygen free radical ถูกปล่อยออกมาได้ นอกจากนี้ในระหว่างที่ phagocytic cell ทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย จะเกิด respiratory burst พร้อมที่จะปล่อย oxygen free radical และ hydrogen peroxide ออกสู่ของเหลวบริเวณนั้น สารทั้งสองนี้ทำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อหรืออีกนัยหนึ่งอาจมีประโยชน์ในการส่งสัญญาณเพื่อให้เกิดกระบวนการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมในรูปการอักเสบ เมื่อเกิด oxidative stress ต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ ไม่ว่า oxidative stress นั้นจะเกิดจาก redox - cycling drugs จากการมี oxygen pressure เพิ่มขึ้นที่เกิด phagocyte activation มากเกินไป เมื่อ superoxide radical (oxygen free radical) และ hydrogen peroxide เพิ่มขึ้น จะก่อให้เกิดพยาธิสภาพของเซลล์ เนื้อเยื่อและอวัยวะได้ ทำให้สามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วกับส่วนประกอบของร่างกาย เช่น กรดนิวคลิอิก โปรตีน อะมิโนอิสระ ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น เป็นผลให้เอนไซม์ที่ผนังเซลล์ gene expression หรือกลไกอื่น ๆ ทำงานผิดปกติได้ ร่างกายจึงเกิดโรคพยาธิสภาพต่างๆเนื่องจากผลของ oxygen free radical และหากมีสารโลหะที่พอเหมาะอยู่ด้วย เช่น เหล็ก ปฏิกิริยาดังกล่าวก็อาจรุนแรงมากขึ้นเพราะ superoxide radical และ hydrogen peroxide จะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น hydroxyl radical ซึ่งมีฤทธิ์ทำลายแรงกว่าแต่มีค่าครึ่งชีวิตสั้น ดังปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + {}^{\cdot}OH + OH^{-}$$

ผลของปฏิกิริยาเหล่านี้คือ เซลล์จะขาด NADH (reduced form ของ nicotinamide adenine dinucleotide) , GSH (reduced glutathione) และ ATP เป็นผลให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์สูงขึ้น จึงเกิดความเสียหายต่อเซลล์ได้ เพื่อป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระคอยทำลายอนุมูลอิสระเหล่านี้ มีผู้รายงานว่า polyunsaturated fatty acid ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ก็อาจถูกทำลายด้วย radical เหล่านี้เช่นกันดังปฏิกิริยา

$$LH + HO^{\cdot} \rightarrow L^{\cdot} + H_2O$$
$$L^{\cdot} + O_2 \rightarrow LOO^{\cdot}$$
$$LOO^{\cdot} + LH \rightarrow LOOH + L^{\cdot}$$

ปฏิกิริยาดังกล่าวคือการเกิด peroxidation ของไขมัน ซึ่งเห็นได้ว่าเริ่มต้นจาก LH คือ polyunsaturated fatty acid เมื่อทำปฏิกิริยา กับ hydroxyl radical และทำปฏิกิริยาต่อเนื่องกับ molecular oxygen จนได้ $LOO^{\cdot}$ คือ lipid peroxyl radical อนุมูล $LOO^{\cdot}$ ที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยาต่อให้ lipid hydroperoxide (LOOH) และ radical species ใหม่อีกชนิดหนึ่งซึ่งสามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ได้เช่นเดิมดังนี้

$$LOOH + FE^{3+} \rightarrow LOO^{\cdot} + FE^{2+} + H^{+}$$
$$LOOH + FE^{2+} \rightarrow LOO^{\cdot} + FE^{3+} + OH^{-}$$

นั่นคือ ถ้ามีเหล็กอยู่ในบริเวณที่เกิด lipid peroxidation ปฏิกิริยานี้จะไม่มีหยุด เพราะจะเกิด hydroxyl radical เป็นระยะๆ ซึ่งผลของปฏิกิริยาดังกล่าวจะทำให้ผนังเซลล์ซึ่งมีไขมันเป็นองค์ประกอบอยู่มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลง permeability ของเซลล์ย่อมเปลี่ยนแปลงไปด้วย ร่างกายจึงมีกลไกที่ป้องกันปฏิกิริยาลูกโซ่นี้ได้คือ ปฏิกิริยาที่อาศัย reduced glutathione และซีลีเนียมเพื่อรีดิวซ์ peroxidize fatty acid กลับมาได้ (ศรีจันทร์, 2546)

นอกจากอนุมูลอิสระจะมีผลต่อไขมันซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์แล้วไขมันของร่างกายซึ่งอยู่ในรูป lipoprotein ก็ถูกเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติได้ เช่น เมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระซึ่งได้ผลดังกล่าวนี้เกี่ยวข้องโดยตรงกับการเกิด atherosclerosis และหลอดเลือดหัวใจอุดตัน

2.3.2 อนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกาย

การติดเชื้อจากแบคทีเรียและไวรัส การอักเสบชนิดไม่ทราบสาเหตุ (autoimmune diseases) เช่น ข้ออักเสบ รูมาตอยด์ โรคเก๊าท์ รังสี สิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษ เช่น ควันเสียและเขม่าจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องยนต์ ควันบุหรี่ ยาฆ่าแมลง การออกกำลังกายอย่างหักโหม โดยหลักการทางเคมีอนุมูลอิสระและ ROS เกิดโดย

1. ปฏิกิริยาการแยกอย่างสมมาตร (Symmetric separation)

$$X - X \rightarrow X^{\cdot} + X$$

2. อนุมูลอิสระอื่น ๆ

$$X^{\cdot} - HR \rightarrow HX + R^{\cdot}$$

จากที่กล่าวมาแล้วว่าอนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาทั้งจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกายและในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษ โดยในภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจำเป็นที่ร่างกายต้องหาทางป้องกัน การโดนทำลายจากอนุมูลอิสระเหล่านั้น สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเอง คือระบบการต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ สามารถจะชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร (substrate) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยสารเหล่านี้รวมถึงสารเกือบทุกชนิดในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ดีเอ็นเอ แต่อย่างไรก็ตามมีบางภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินกว่าที่ระบบแอนตี้ออกซิแดนท์จะจัดการได้ จะเกิดภาวะที่เรียกว่า Oxidative stress ขึ้นมาซึ่งจะส่งผลกระทบต่างๆ ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเกิดการทำลายของกลุ่มโมเลกุลที่มีพันธะ S-H และ เยื่อหุ้มเซลล์ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์ และการทำลายเซลล์0ซึ่งเป็นสาเหตุของการแก่ (aging) และรุนแรงไปถึงการเกิดเป็นโรคภัยไข้เจ็บต่าง ๆ เช่น0เส้นเลือดตีบ0โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (autoimmune disease) โรคที่เกิดจากการที่เลือดกลับไปเลี้ยงอวัยวะที่เคยมีการตีบตันของเส้นเลือดในระยะสั้นๆ มาก่อน (reoxyge-nation injury, reperfusion injury) ซึ่งรวมไปถึงโรคมะเร็งเป็นต้น การทำลายโมเลกุลที่เป็นต้นเหตุของการเกิดของอนุมูลอิสระนับเป็นกลไกการทำงานของระบบการต่อต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญกลไกหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่อาศัยเอนไซม์หรือไม่ก็ได้ สารต่อต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกายและจัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่ Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPX) และ Glutathione reductase (GR)

สารต่อต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย แต่ไม่จัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่ Glutathione, Lipoic acid, Ceruloplasmin, Albumin, Transferrin, Haptoglobin, Hemopexin และ Uric acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารต่อต้านอนุมูลอิสระที่พบในอาหารและไม่จัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่ Tocopherols, Carotenoids, Ascorbic acid, Steroids, Ubiquinones, Thiols, Inosine, Taurine, Pyruvate, Gallic acid, Flavonoids, Trolox, BHT และ BHA

การหาขีดความสามารถในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระของสารต่อต้านอนุมูลอิสระทำโดยขั้นแรกจะเป็นสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมาก่อน แล้วจึงเติมสารต่อต้านอนุมูลอิสระลงไป จากนั้นทำการตรวจวัดหาอนุมูลอิสระที่เหลือหลังจากการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งหลักการนี้เองสามารถนำไปใช้ได้หลากหลาย ขึ้นอยู่กับการเลือกชนิดของตัวกำเนิดอนุมูลอิสระและชนิดของตัว ตรวจวัดอนุมูลอิสระ (http://www.gpo.or.th)

2.4 แบคทีเรีย

2.4.1 ลักษณะของแบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็ก ประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียว มีขนาดประมาณ 0.5 – 10 ไมโครเมตร สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มโดยการจัดจำแนกตามรูปร่างลักษณะได้ 3 ลักษณะ คือ รูปร่างกลม (coccus) รูปร่างแท่ง (rod) รูปร่างเป็นเกลียว (spiral) โดยปกติแบคทีเรียจะอยู่รวมกลุ่มกันเรียกว่า โคโลนี (colonies) ซึ่งสามารถมองเห็นได้ เมื่อแยกแบคทีเรียออกเป็นเซลล์เดี่ยวแล้วจะไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า แต่สามารถมองเห็นผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 – 1000 เท่าได้ แบคทีเรียสามารถแบ่งตามการติดสีเมื่อนำไปย้อมสีแกรมได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

1. แบคทีเรียแกรมบวก เมื่อย้อมสีแกรมแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงน้ำเงินของ Cristal violet

2. แบคทีเรียแกรมลบ เมื่อย้อมสีแกรมแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีส้มแดงของ Safanin

การติดสีแกรมของแบคทีเรียมีผลจากปัจจัยหลายประการ เช่น โครงสร้างทางเคมีของผนังเซลล์ ความหนาของเซลล์แบคทีเรีย ระยะเวลาในการย้อมสีและอายุของแบคทีเรีย การจำแนกแบคทีเรียนี้จะเป็นประโยชน์ประกอบการตัดสินใจเลือกยาที่ใช้ในการรักษาโรคให้มีประสิทธิภาพ (นงลักษณ์และคณะ, 2544)

2.4.2 แบคทีเรียก่อโรค

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีกระจัดกระจายอยู่ทั่วไป มีทั้งชนิดที่เป็นโทษคือทำให้เกิดโรคเจ็บป่วยและชนิดที่ไม่เป็นโทษค่อร่างกาย หรือบางชนิดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในร่างกายของเราเพื่อช่วยสร้างความสมดุล และคอยป้องกันเชื้อโรคที่เป็นอันตรายได้ระดับหนึ่ง แต่ในบางครั้งเมื่อร่างกายเกิดความอ่อนแอลง เชื้อประจำถิ่นอาจเพิ่มจำนวนมากเกินไปจนทำให้เสียสมดุลและเกิดความผิดปกติได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรีย จะมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถมองด้วยตาเปล่า ดังนั้นเมื่อเกิดความผิดปกติขึ้น อาการของโรคที่เกิดขึ้น เช่น เจ็บคอ ทอลซินอักเสบแดง มีเสมหะเป็นสีเหลือง/เขียว แผลเป็นหนอง ปวด บวม ร้อน เป็นต้น ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่เป็นอันตรายได้เข้ามาสู่ร่างกายตามช่องทางต่าง ๆ เช่น ปาก คอ หู ตา จมูก ทวาร บาดแผล เป็นต้น เมื่อแบคทีเรียที่เป็นอันตรายเข้ามาในร่างกายเรา ธรรมชาติร่างกายของมนุษย์ก็จะมีหน่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอม เช่นเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ ที่จะมากำจัดเชื้อโรค ถ้าหน่วยทหารร่างกายชนะคือสามารถกำจัดทำลายสิ่งแปลกได้ ร่างกายอาจผิดปกติเพียงเล็กน้อยหรืออาจไม่มีอาการผิดปกติอะไรเลย แต่ถ้าร่างกายไม่สามารถกำจัดได้ทัน เนื่องจากเชื้อโรคมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เข้ามาแบบกองโจรแล้วรีบหลบซุ่มฟักตัวในจุดที่เม็ดเลือดขาวตามไม่พบ หรือในช่วงร่างกายกำลังอ่อนแอ กองทัพเม็ดเลือดขาวไม่แข็งแรงหรือมากพอที่จะกำจัด ในระหว่างการต่อสู้เพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม จะมีการระดมเม็ดเลือดขาวมาในบริเวณติดเชื้ออย่างมาก ทำให้เห็นเป็นหนองมีอาการปวด บวม แดง เป็นต้น ถ้ากองกำลังเม็ดเลือดขาวด่านแรกสู้ไม่ได้เจ้าเชื้อโรคก็จะทำให้เกิดการเจ็บป่วยต่างๆนานา ตามลักษณะของเชื้อ เช่น ท้องร่วง ท้องเสีย เจ็บคอ มีไข้ ปอดบวมได้มากมายเมื่อเกิดอาการผิดปกติ ข้างต้นขึ้น ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์

รูปที่ 4 *Staphylococcus aureus*

ที่มา : http://www.techno.msu.ac.th

2.4.2.1 *Staphylococcus aureus*

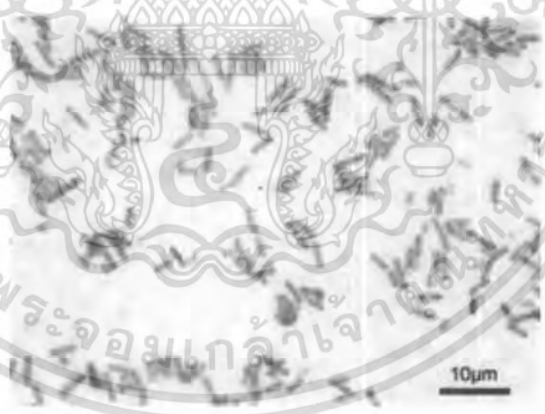
เชื้อชนิดนี้ เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม มักพบเป็นคู่เกาะกันด้วยสายสั้น ๆ เป็นกิ่งหรือเป็นลักษณะพวงองุ่นเป็นแบคทีเรียแกรมบวก บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษที่เป็นโปรตีนซึ่งทนต่อความร้อนได้ดีและเป็นสาเหตุให้เกิดอาการเจ็บป่วยในมนุษย์ซึ่งโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *Staphylococcus* นั้นมีชื่อเรียก คือ Stapyhloenterotoxicosis,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Staphylorenterotoxemia เหล่านี้เป็นชื่อของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Staphylococcus aureus*

เชื้อ *Staphylococcus aureus* จะมีชีวิตอยู่ในอากาศ ฝุ่นละออง ขยะมูลฝอย น้ำ อาหารและนม หรืออาหารบรรจุเสร็จ สภาวะแวดล้อมภายนอกมนุษย์และสัตว์ ซึ่งมนุษย์และสัตว์นั้นเป็นแหล่งปฐมภูมิของเชื้อชนิดนี้โดยจะพบอยู่ตามทางเดินหายใจ ลำคอ หรือ เส้นผมและผิวหนังถึง 50% หรือมากกว่านี้ในคนที่มีสุขภาพดี และอาจพบเชื้อชนิดนี้ 60-80 %ในผู้ที่สัมผัสโดยตรงกับผู้ป่วยหรือผู้ที่สัมผัสกับสภาพแวดล้อมในโรงพยาบาล ตลอดจนผู้ประกอบอาหาร รวมทั้งในขั้นตอนของการบรรจุและสภาพแวดล้อมภายนอกนั้นก็เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน สิ่งที่ต้องคำนึงถึงอีกอย่างหนึ่งก็คือการเก็บอาหารไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมเป็นผลให้อาหารที่มีการปนเปื้อนอยู่แล้วมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อและสร้างสารพิษอย่างรวดเร็ว

อาการของโรค ลักษณะอาการที่บ่งบอกว่าติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* นั้นจะแสดงให้เห็นอย่างรวดเร็วและรุนแรงในหลาย ๆ กรณี โดยทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับสภาพความต้านทานสารพิษ ของร่างกาย ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารและปริมาณสารพิษที่สร้างขึ้นในอาหาร รวมทั้งสภาพร่างกายโดยทั่วไปของผู้ที่ได้รับเชื้อด้วยอาการทั่วไปที่พบคือผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้องและอ่อนเพลีย ในผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการอื่นแทรกซ้อน หลายรายจะมีอาการปวดหัวเป็นตะคริวที่กล้ามเนื้อ และมีการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตเป็นระยะ ๆรวมทั้งอาจมีการเต้นของชีพจรผิดปกติ (http://www.techno.msu.ac.th)



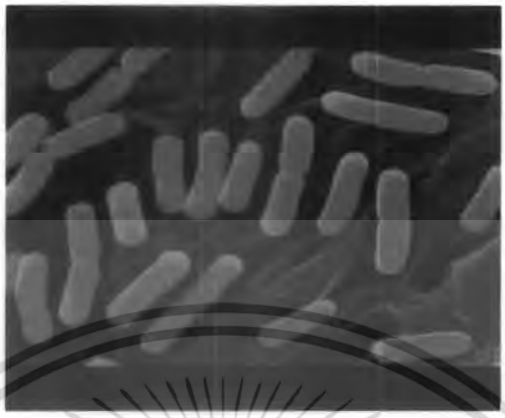
รูปที่ 5 *Bacillus subtilis*
ที่มา : http://www.techno-science.net

2.4.2.2 *Bacillus subtilis*

เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ Catalase สามารถพบได้ทั่วไปในดินอยู่ในจีนัส *Bacillus* สร้าง Endospore โดยทนสภาวะที่ไม่เหมาะสมมาก ๆ ได้ *Bacillus subtilis* เป็นพวกที่ต้องการอากาศอย่างแท้จริง *Bacillus subtilis* เป็นเชื้อที่ไม่ทำอันตรายต่อมนุษย์โดยตรงแต่จะเป็นจุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

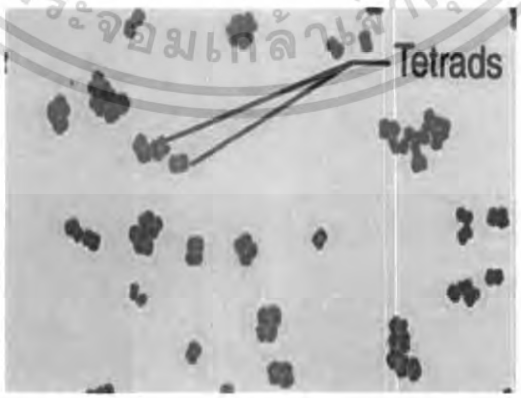
ลินทรีย์ที่เป็นเหตุให้เกิดอาการเป็นพิษ โดยสปอร์สามารถอยู่รอดได้ในอาหารที่ให้ความร้อนสูงและยังทำให้เกิดเมือกในขนมปัง



รูปที่ 6 การติดสีแกรม รูปร่าง และการเรียงตัวของ *Escherichia coli*
ที่มา : http://www.astrographics.com

2.4.2.3 ***Escherichia coli***

รูปร่างเป็นท่อนตรง เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน และไร้ออกซิเจนปกติเชื้อ *E.coli เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น* (normal flora) ที่พบมากในลำไส้ของคนละสัตว์ แต่มีเชื้อ E.coli บาง (serotype) ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงได้ในคนละสัตว์ โดยการปนเปื้อนเชื้อในอาหารและน้ำดื่ม ปวดท้องอย่างรุนแรง ต่อมาถ่ายเป็นเลือดปน หรือเลือดสด บางรายไม่ถ่ายเป็นเลือด อาจอาเจียน ไม่มีไข้ หรือมีไข้เล็กน้อย ไม่มีมูกปน ระยะฟักตัวของโรค 3 – 9 วัน ในส่วนที่เรียกว่า Submucosal edema มีการหดตัวอย่างรุนแรง ลำไส้ขดงอ และมีเลือดคั่ง

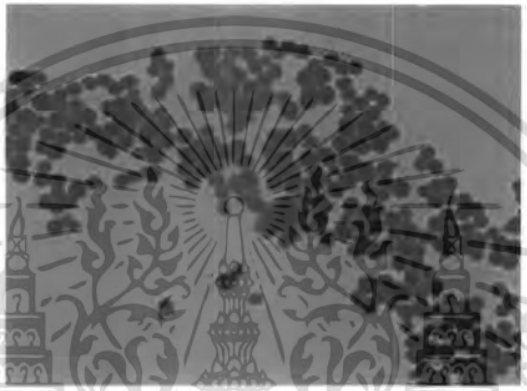


รูปที่ 7 *Micrococcus luteus*
ที่มา : http://faculty.mc3.edu

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.4 *Micrococcus luteus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีลักษณะกลมเป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์สารใน Family ของ Micrococaceae ลักษณะถิ่นที่อยู่ที่พบได้ทั่วไปในดิน ฝุ่นละออง น้ำและอากาศ นอกจากนี้ยังเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นบนผิวหนังของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยพบในมนุษย์บริเวณปาก เยื่อเมือก ทางเดินหายใจ นอกจากนี้ *Micrococcus luteus* พบจากการติดเชื้อจากการรักษาในโรงพยาบาลด้วย *Micrococcus luteus* สามารถทนต่อความแห้งแล้งและปริมาณความเข้มข้นของเกลือที่สูงได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 8 *Candida albicans*

ที่มา : http://www.venereology.ru/kandidoz-kandida.php

2.4.2.5 *Candida albicans*

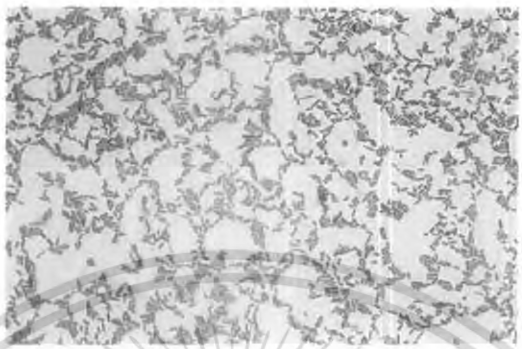
เป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 – 20 ไมโครเมตร มีการสร้างเส้นสายเทียม (Pseudohyphae) ขณะทำการแบ่งเซลล์โดยปกติจะมีลักษณะเซลล์เป็นวงรีเป็นเซลล์เดี่ยวมีการขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อ แต่เมื่ออยู่ในอุณหภูมิของร่างกายมนุษย์จะมีการสร้างเส้นสาย (Hypha) ออกมา โดย *Candida albicans* เป็นสาเหตุของการเกิดโรค Candidiasis โดยพบในร่างกายมนุษย์ปกติด้วยแต่จะไม่แสดงอาการของโรค แต่เมื่อร่างกายอ่อนแอเชื้อจะแสดงอาการออกมาในลักษณะของเชื้อฉวยโอกาส การติดเชื้อจะติดเชื้อที่ผิวหนัง เยื่อเมือกหรืออาจติดในกระแสเลือด

2.4.2.6 *Pseudomonas aeruginosa*

เป็นเชื้อก่อโรคประเภทฉวยโอกาส โดยจะเข้าทำให้เกิดโรคขณะร่างกายอ่อนแอ เป็นแบคทีเรียแรมลบต้องการอากาศในการหายใจ มีลักษณะเป็นท่อนอยู่ใน Family ของ Pseudomonadaceae โดยถิ่นที่อยู่นั้นพบได้ทั่วไปทั้งในดินและน้ำ นอกจากนี้ยังพบตามผิวของพืชและสัตว์บางชนิดด้วย สามารถชักนำให้ก่อโรคในพืชได้ด้วยและยังเป็นสาเหตุหนึ่งของการติดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
72610

ในทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ โรคผิวหนัง การติดเชื้อในอวัยวะภายใน พบในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็ง ผู้ป่วยที่เกิดจากแผลไฟไหม้หากมีการติดเชื้อจะมีอัตราการตาย ถึง 50 %



รูปที่ 9 *Pseudomonas aeruginosa*
ที่มา : http://medecinepharmacie.univ-fcomte.fr

2.5 การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพรและการตรวจสอบสาระสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (Preparation of Raw Materials and Phytochemical Screening)

สมุนไพรที่จะนำมาสกัดอาจอยู่ในรูปพืชสดหรือพืชแห้ง สิ่งที่ต้องคำนึงถึงประการแรกคือต้องมีการตรวจเอกลักษณ์ให้ถูกต้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชสมุนไพรที่เก็บจากป่าอาจเกิดความผิดพลาดได้ง่าย เนื่องจากพืชมีลักษณะคล้ายกัน หรือมีชื่อพ้องกัน นอกจากนี้หากเป็นพืชสมุนไพรที่หายากและขาดแคลนอาจมีการปนปลอม สำหรับพืชสมุนไพรที่ได้จากการเพาะปลูกไม่ค่อยมีปัญหาเรื่องนี้ และแน่ใจได้ว่าเป็นพืชที่ถูกต้องเชื่อถือได้ (รัตนา, 2547)

2.5.1 การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร (Preparation of raw materials)

ปริมาณสาระสำคัญในสมุนไพรขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ฤดูการเก็บเกี่ยว ระยะเวลาที่เก็บพืช สภาพดิน สภาพอากาศ ปริมาณน้ำ ชนิดและปริมาณสัดส่วนของอาหารเสริม เป็นต้น ฤดูการที่เก็บพืชสมุนไพรมีความสำคัญมากต่อปริมาณ ชนิดและองค์ประกอบสำคัญในพืชสมุนไพร ควรเก็บในฤดูกาลตามระยะเวลา (อายุ) ที่มีปริมาณและชนิดองค์ประกอบสำคัญสูงสุด ในส่วนของพืชที่ต้องการอายุของพืชเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดปริมาณสาระสำคัญที่ผลิตขึ้น โดยทั่วไปหลักการเก็บส่วนต่างๆของพืชสมุนไพรมีดังนี้

รากและเหง้า เก็บหลังจากพืชเจริญเติบโตเต็มที่แล้วและหยุดการเจริญเติบโต หากเป็นพืชล้มลุกควรเก็บเมื่อต้นตาย

เปลือกต้น เก็บเวลาที่เหมาะสม เช่นเปลือกต้นซิงโคนา (cinchona) เก็บเมื่อต้นมีอายุ 3-9 ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบและยอด เก็บก่อนที่พืชจะออกดอกหรือก่อนที่ดอกจะบาน

ดอก เก็บขณะที่ดอกกำลังบาน หรือ ก่อนที่ดอกจะบาน

ผล เก็บเมื่อผลเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว แต่ยังไม่สุก หรือเมื่อสุกเต็มที่ แล้วแต่ชนิดของสมุนไพร

เมล็ด เก็บเมื่อแก่เต็มที่แล้ว แต่ควรเก็บก่อนที่ผลแตกออก

พืชสมุนไพรที่เก็บเกี่ยวได้ต้องตรวจสอบว่าไม่มีพืชชนิดอื่น หรือสารอื่นเจือปน เนื่องจากอาจรบกวน (interfere) การตรวจสอบ และการสกัดแยกสาระสำคัญในขั้นตอนต่อไป นอกจากนี้ควรสะอาดปราศจากสิ่งแปลกปลอม ไม่มีเชื้อราหรือโรคพืชที่ติดมา เนื่องจากจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช อาจให้สารที่ถูกสกัดออกมาพร้อมกับสารที่ต้องการ หรือจุลินทรีย์เหล่านี้อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ในพืช ได้สารที่แตกต่างออกไปจากธรรมชาติ โดยทั่วไปแล้วการสกัดจะได้ผลดีเมื่อสามารถสกัดสารจากพืชสด โดยนำพืชสดมาต้มกับแอลกอฮอล์เพื่อฆ่าเอนไซม์ ก่อน ป้องกันไม่ให้สารเคมีภายในพืชเปลี่ยนแปลงแล้วจึงนำไปสกัด แต่วิธีดังกล่าวไม่สะดวก จึงจำเป็นต้องนำตัวอย่างพืชสดมาทำให้แห้งก่อน เพื่อรักษาคุณภาพของสมุนไพรให้ดีที่สุดก่อนนำไปสกัด และเพื่อป้องกันการบูดเน่าเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ นอกจากนี้การทำให้แห้งยังช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในพืชสด จึงควรทำให้แห้งด้วยวิธีที่เร็วและใช้อุณหภูมิต่ำ เพราะอุณหภูมิสูงจะทำให้สาระสำคัญสลายหรือเปลี่ยนแปลงได้ การทำแห้งอาจใช้แสงแดด หรือความร้อนจากเครื่องมือช่วย การใช้เครื่องมือดีกว่าเนื่องจากมีการควบคุมอุณหภูมิและความสม่ำเสมอของการหมุนเวียนของอากาศได้ (Bravo, 1998)

ระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้พืชแห้งแตกต่างกันออกไป โดยทั่วไปดอก ใบ และยอด จะใช้อุณหภูมิที่ 20-40 องศาเซลเซียส ส่วนเปลือกและรากใช้อุณหภูมิที่ 30 - 65 องศาเซลเซียส พืชสมุนไพรบางชนิดเภสัชตำรับได้กำหนดอุณหภูมิที่ทำแห้งไว้

เมื่อพืชสมุนไพรแห้งแล้วควรเก็บรักษาไว้ให้เหมาะสม กล่าวคือ ไว้ที่แห้งมืด เย็นและมีอากาศหมุนเวียนให้เหมาะสม เพื่อให้มีคุณภาพสูงก่อนทำการแยกสกัด โดยทั่วไปควรหลีกเลี่ยงการเก็บสมุนไพรไว้เป็นเวลานาน ๆ ในเภสัชตำรับกำหนดความชื้นที่อนุญาตให้มีได้ในพืชสมุนไพรแต่ละชนิด เนื่องจากความชื้นเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี อีกยังเพิ่มน้ำหนักสมุนไพร ทำให้เปอร์เซ็นต์ขององค์ประกอบสาระสำคัญลดลงด้วย

ก่อนทำการสกัดต้องมีการย่อยขนาดให้เล็กลง (comminution or pulverization) เพื่อให้การสกัดสาระสำคัญจากพืชได้ผลดี เนื่องด้วยจากองค์ประกอบสำคัญจะอยู่ภายในเซลล์ ในสภาพผลึกหรือผงละเอียด เมื่อได้สัมผัสกับน้ำยาสกัดที่เหมาะสม องค์ประกอบเหล่านั้นจะละลายออกมา การสกัดสมบูรณ์ถ้าเซลล์แตกออกและน้ำยาสกัดเข้าไปสัมผัสกับองค์ประกอบสำคัญได้มากที่สุด ดังนั้นในการสกัดพืชสมุนไพรจึงจำเป็นต้องบดพืชสมุนไพรให้ละเอียด เพื่อทำลายผนังเซลล์และเพิ่มพื้นที่ผิวสมุนไพรที่จะสัมผัสกับน้ำยาสกัด การลดขนาดของพืชสมุนไพรให้เป็นผงละเอียดควร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนึงถึงโครงสร้างของพืชสมุนไพรเป็นหลัก ถ้าเป็นโครงสร้างแข็งแรง ซึ่งน้ำยาสกัดแทรกซึมเข้าไปยาก เช่น เปลือกไม้ ราก ควรบดให้มีขนาดเล็กกว่าส่วนที่มีโครงสร้างอ่อนนุ่ม ซึ่งน้ำยาสกัดแทรกซึมเข้าๆไปง่าย เช่น ใบ ดอก การบดพืชสมุนไพรให้มีขนาดเล็กมากเกินไปจะเกิดผลเสียได้ คือทำให้เกิดการอุดตันเครื่องกรองในขบวนการสกัด และทำให้ได้องค์ประกอบที่ไม่ต้องการมากขึ้นเนื่องจากเซลล์แตกมากเกินไป (รัตนา, 2547)

2.5.2 การตรวจสอบสาระสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (phytochemical screening)

เป็นวิธีการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของการสกัดในพืช เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นว่ามีสารเคมีกลุ่มใดบ้างที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacological action) เช่น กลุ่มแอลคาลอยด์ (alkaloids) กลุ่มไกลโคไซด์ (glycosides) เป็นต้น ทำให้สามารถวางแผนการสกัดแยกตามคุณสมบัติทางเคมีของสารกลุ่มนั้นได้ (รัตนา, 2547)

การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารกลุ่มต่าง ๆ ในพืชควรเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และค่อนข้างจำเพาะกับกลุ่มสารเคมีที่ต้องการ มี 2 วิธีคือ

- การตรวจสอบโดยปฏิกิริยาสีหรือการเกิดตะกอน
- การตรวจสอบโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography)

ก่อนทำการตรวจสอบต้องเตรียมสารสกัดให้เหมาะสม ซึ่งมักจะมีปัญหาในการเลือกตัวทำละลาย เนื่องจากสารประกอบในพืชมีมากมายหลายชนิด และมีคุณสมบัติแตกต่างกัน การเลือกตัวทำละลายที่จะทำให้ได้สารกลุ่มที่ต้องการจึงทำได้ยาก นอกจากนี้อาจมีปัญหาเรื่องการที่สารหลายชนิดอยู่ปนกัน เกิดการจับกันอย่างหลวม ๆ ทำให้การละลายของสารแตกต่างกันออกไปจากคุณสมบัติในการละลายของสารแต่ละชนิด ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะหาตัวทำละลายที่สมบูรณ์สามารถสกัดสารได้ทุกชนิด ส่วนใหญ่นิยมใช้แอลกอฮอล์ หรือส่วนผสมของแอลกอฮอล์และน้ำความเข้มข้นร้อยละ 80 เนื่องจากสามารถละลายได้ทั้งสารมีขั้ว (polar) และไม่มีขั้ว (non-polar) แม้ว่าจะไม่ใช่ตัวทำละลายที่ดีที่สุดของทุกกลุ่ม แต่สกัดได้จำนวนที่มากพอที่จะตรวจสอบเบื้องต้น

วิธีการสกัดแบบง่าย ๆ ทำได้โดยนำผงยาที่ต้องการมาตรวจสอบมาเติมสารละลายผสมของแอลกอฮอล์และน้ำความเข้มข้นร้อยละ 80 จนท่วมผงยา ทิ้งไว้เป็นเวลา 3-7 วันเขย่าบ่อยๆ หรือในกรณีที่กลุ่มสารนั้นทนความร้อน อาจนำไปรีฟลักซ์ (reflux) บนหม้ออังไอน้ำจนเดือด ½-1 ชม. ก่อนนำมาตรวจสอบควรนำน้ำยาสกัดมาผ่านกระดาษกรองหรือสำลี

(www.chemistry.sc.chula.ac.th)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การสกัดสาระสำคัญจากพืชสมุนไพร (Extraction of Active Constituents from Medicinal Plants)(รัตนา, 2547)

การสกัดสาระสำคัญจากพืชสมุนไพรทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปการสกัดเบื้องต้นไม่ว่าจะสกัดด้วยวิธีการใดหรือใช้ตัวทำละลายใด จะได้องค์ประกอบเป็นของผสมหรือสารสกัดหยาบ (crude extract) ซึ่งเป็นสิ่งที่สกัดออกมาจากสมุนไพรโดยใช้น้ำยาสกัดหรือตัวทำละลาย (solvent) สารสกัดอย่างหยาบนี้เป็นของผสมขององค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรซึ่งจะมีทั้งองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา(pharmacologically active constituents) ซึ่งมักเรียกว่า สาระสำคัญ (active constituent) และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacologically inactive constituents) ซึ่งเรียกว่าสารเฉื่อย (inert substances) ชนิดและสัดส่วนขององค์ประกอบในสารสกัดจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพของสมุนไพรที่ใช้และสภาวะที่ใช้ในการสกัด วัตถุประสงค์ของการสกัดพืชสมุนไพรคือ

- เพื่อสกัดแยกเอาสาระสำคัญออกจากสมุนไพร
- เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นของสาระสำคัญสูง
- เพื่อลดขนาด (dose) ของการใช้สมุนไพรลงให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม

2.6.1 น้ำยาสกัดหรือตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการเตรียมสารสกัด ได้แก่ น้ำ (water) แอลกอฮอล์ (alcohol) หรือสารละลายผสมของสารละลายทั้ง 2 ชนิดนี้ นอกจากนี้อาจใช้กรด ด่าง เติมลงในน้ำยาสกัดเพื่อปรับความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาสกัดให้เหมาะสมยิ่งขึ้น ส่วนสารละลายชนิดอื่นๆ เช่น อีเทอร์ (ether) คลอโรฟอร์ม (chloroform) มีใช้บ้างเฉพาะกรณี

น้ำ จัดว่าเป็นตัวทำละลายที่ดี หาง่ายและราคาถูก แต่การใช้น้ำอย่างเดียวเป็นตัวทำละลายในการสกัดพืชสมุนไพรมีข้อเสียหลายประการ คือ สามารถละลายองค์ประกอบที่ไม่ต้องการออกมาได้มาก เช่นเดียวกับสาระสำคัญที่ต้องการ สารเฉื่อยที่ออกมากับน้ำ เช่น น้ำตาล, แป้ง ล้วนเป็นอาหารที่ดีของเชื้อจุลินทรีย์ จึงทำให้เกิดการบูดเสียของสารสกัดเนื่องจากจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้น้ำระเหยได้ที่อุณหภูมิสูง ถ้าต้องการทำให้สารสกัดในน้ำเข้มข้นจะต้องใช้อุณหภูมิสูงในการระเหยไล่น้ำออกไป ซึ่งอาจจะเกิดความเสียหายกับสาระสำคัญได้ ดังนั้นจึงไม่ค่อยนิยมใช้น้ำเดี่ยวๆ เป็นน้ำยาสกัด แต่ใช้ร่วมกับตัวทำละลายอื่นๆ

แอลกอฮอล์ จัดเป็นตัวทำละลายที่ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำ แอลกอฮอล์มีข้อดีกว่าดังนี้

- มีความจำเพาะ (Selectivity) ในการละลายมากกว่าน้ำ
- มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์
- หากต้องการทำให้สารสกัดเข้มข้นจะระเหยง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำยาผสมแอลกอฮอล์ (Hydroalcoholic mixture) เป็นน้ำยาสกัดที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถละลายสาระสำคัญในพืชสมุนไพรได้ใกล้เคียงกับแอลกอฮอล์ แต่ราคาถูกกว่า และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้อีกด้วย นอกจากนี้การใช้น้ำยาผสมแอลกอฮอล์ ยังช่วยป้องกันการแยกตัวของสารต่างๆในสารสกัดเมื่อตั้งทิ้งไว้ ซึ่งมักเกิดขึ้นในกรณีที่ใช้น้ำอย่างเดียวในการสกัด

นอกจากน้ำยาสกัดต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น ตัวทำละลายอินทรีย์อาจใช้ในการสกัดพืชสมุนไพรได้เช่น เฮกเซน (hexane) และ ปิโตเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) ใช้สกัดพืชสมุนไพรในขั้นต้นเพื่อขจัดสารพวกไขมันออกไปก่อนที่จะทำการสกัดขั้นตอนต่อไป ตัวทำละลายเหล่านี้นิยมใช้สกัดองค์ประกอบที่ไม่มีขั้ว (on-polar component) เช่น ไขมัน (lipids) สเตียรอยด์ (steroids) เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) เป็นต้น

คลอโรฟอร์ม (Chlorofrom) และอีเทอร์ (ether) จัดเป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว (polarity) ปานกลาง ใช้สกัดองค์ประกอบที่ไม่มีขั้ว (non-polar component) ไปจนถึงสารที่มีขั้วปานกลาง เอทานอล (methanol) เป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัดสาระสำคัญที่มีขั้ว (polar active constituent) เช่นเดียวกับแอลกอฮอล์ แต่นิยมใช้แอลกอฮอล์ มากกว่าเพราะราคาถูก และมีความเป็นพิษน้อยกว่า

2.6.2 การเลือกน้ำยาสกัด

หลังจากทำการเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพรสำหรับการสกัดแล้วควรเลือกน้ำยาสกัดให้เหมาะสม กับชนิดของสารที่ต้องการสกัด โดยน้ำยาสกัดดังกล่าวควรมีคุณสมบัติดังนี้

2.6.2.1 มีความสามารถในการละลายสาระสำคัญได้มากที่สุดและไม่ละลายองค์ประกอบอื่นๆ หรือละลายองค์ประกอบอื่นๆ ได้น้อย ในการเลือกน้ำยาสกัดมีกฎทั่วไปว่า สิ่งที่เหมือนกันย่อมละลายกันและกัน (like dissolve like) เช่น คุณสมบัติของสาระสำคัญมีขั้ว ก็ควรเลือกตัวทำละลายหรือน้ำยาสกัดที่มีขั้วเช่นเดียวกันในการสกัด

2.6.2.2 มีความคงตัวดี และหาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย

2.6.2.3 ไม่ระเหยง่าย หรือยากเกินไป

2.6.2.4 สภาพของพืชสมุนไพรที่ทำการสกัด เช่น เมล็ด เป็นส่วนที่มีไขมันอยู่มาก ควรขจัดไขมันพวกนี้ออกก่อนโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ประเภทไม่มีขั้ว เช่น ปิโตเลียมอีเทอร์ เป็นต้น แล้วจึงนำกากพืชที่เหลือไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม (http://www.chemistry.sc.chula.ac.th)

2.6.3 การทำสารสกัดให้เข้มข้น (Concentration) (รัดนา, 2547)

สารสกัดหยาบที่ได้จะมีปริมาตรมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวก และไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นก่อนโดยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

2.6.3.1 การระเหย (Free evaporation) เป็นการนำตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัด โดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) หรือแผ่นความร้อน (hot plate) วิธีนี้อาจทำให้

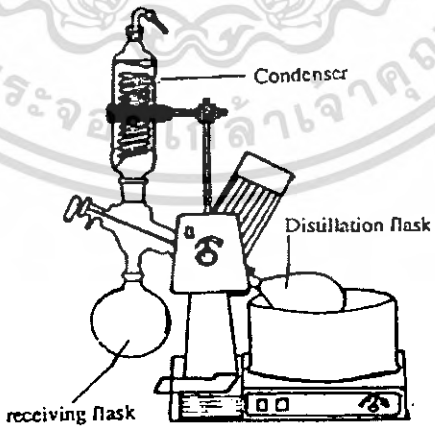
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องค์ประกอบในสารสกัดสลายตัวได้เนื่องจากอุณหภูมิสูงเกินไป และหากใช้สารละลายอินทรีย์ ในการสกัด การระเหยโดยให้ความร้อนโดยตรง บนแผ่นความร้อนอาจเกิดอันตรายได้ง่าย

2.6.3.2 การกลั่นในภาวะสุญญากาศ (Distillation in vacuum) จัดว่าเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดโดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ พร้อมทั้งลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า โรตารีอีวาโพเรเตอร์ (rotary evaporator) ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนต่างๆ 3 ส่วน คือภาชนะบรรจุสารสกัดหยาบที่กลั่น (distilliation flask) ส่วนคอนเดนเซอร์ หรือตัวควบแน่นไอสารระลาย (condenser) และภาชนะรองรับสารละลายหลังกลั่น (receving flask) โดยสารสกัดหยาบซึ่งบรรจุในภาชนะจะแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้และจะหมุนตลอดเวลาที่ทำงานเพื่อให้มีการกระจายความร้อนอย่างทั่วถึง ภาชนะบรรจุสารสกัดหยาบนี้จะต่อเข้ากับส่วนควบแน่น ซึ่งมีระบบทำความเย็นอยู่ตลอดเวลา ปลายของส่วนควบแน่นจะมีภาชนะรองรับ โดยทั้งระบบจะต่อเข้ากับระบบสุญญากาศ สารละลายที่ระเหยออกจากภาชนะบรรจุจะควบแน่นที่บริเวณคอนเดนเซอร์และหยดลงมาในภาชนะรองรับสารละลายหลังกลั่นซึ่งสารละลายดังกล่าวสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และนำกลับมาใช้ใหม่ได้

2.6.3.3 การทำให้แห้ง (drying) เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดจนแห้งได้สารสกัดออกมาในสภาพของแข็งหรือกึ่งของแข็ง มีหลายวิธี เช่นการใช้ความเย็น (lyophilizer หรือ freeze dryer) หรือการใช้ความร้อน (spray dryer)

2.6.3.4 อัลตราฟิวเทรชั่น (ultrafiltration) เป็นการทำสารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้แผ่นเมมเบรน (membrane) ใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 5,000



รูปที่ 10 เครื่องโรตารีอีวาโพเรเตอร์ (นันทวัน , 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 การแยกองค์ประกอบสำคัญจากพืชสมุนไพร (Isolation the Active Ingredients from Medicinal Plants) (รัตนา, 2547)

เนื่องด้วยสารสกัดหยาบ (crude extract) ประกอบด้วยสารหลายชนิดมากมาย ซึ่งมีทั้งสาระสำคัญ (active constituents) และองค์ประกอบอื่นๆที่ไม่ต้องการ ดังนั้นการแยกสาระสำคัญให้อยู่ในสภาพบริสุทธิ์นั้น จัดเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุด ซึ่งทำได้ 2 แบบคือ การแยกสารโดยใช้คุณสมบัติและปฏิกิริยาทางเคมี (chemical means) เช่น ความเป็นกรด ความเป็นด่าง การละลาย เป็นต้น และ การแยกสารโดยใช้คุณสมบัติทางฟิสิกส์ (physical means) เช่น การกลั่น การเหวี่ยง (centrifugation) การสกัดด้วยของเหลวสองชนิด การตกผลึกแยกส่วน การดกตะกอน เป็นต้น วิธีที่ใช้บ่อย ๆ ได้แก่

2.7.1 การสกัดด้วยของเหลวสองชนิด (liquid-liquid extaction)

เป็นการแยกสารโดยอาศัยการละลายที่แตกต่างกันในตัวทำละลายที่ผสมกัน (Immiscible solvent) เช่นการแยก เทอเชียรีแอลคาลอยด์ (tertiary alkaloid) ออกจากตัวควาเทอนารีแอลคาลอยด์ (quaternary alkaloid) ในสภาพแอลคาลอยด์อิสระ เทอเชียรีแอลคาลอยด์ ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ดังนั้นถ้าเติมแอลคาลอยด์ทั้งสองชนิดอยู่ในสภาพเกลือ จะละลายอยู่ในน้ำ (aqueous solution)

เมื่อทำให้น้ำยาเป็นด่าง เทอเชียรีแอลคาลอยด์ จะเปลี่ยนเป็นอัลคาลอยด์อิสระซึ่งไม่ละลายในน้ำ หากสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จะได้เทอเชียรีแอลคาลอยด์ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ส่วนควอเทอร์นารีอัลคาลอยด์ ยังคงอยู่ในชั้นน้ำ ซึ่งสามารถแยกอัลคาลอยด์ทั้งสองออกจากกันได้

2.7.2 การกลั่น (distillation)

ใช้แยกสารที่ระเหยได้ออกจากสารที่ไม่ระเหย เช่นแยกคูมาริน (cumarin) ซึ่งระเหยได้ออกจากส่วนอื่น หรือเป็นการกลั่นแยกลำดับส่วน (fractional distillation) ซึ่งใช้แยกสารที่มีจุดเดือดต่างกันโดยการควบคุมอุณหภูมิ สามารถแยกสารได้ตามจุดเดือด

2.7.3 การตกผลึกแยกส่วน (fractional crystallization)

ใช้แยกสารโดยอาศัยการละลายของสารเมื่ออยู่ในตัวทำละลายต่างๆ จะละลายได้ไม่เท่ากัน เมื่อเปลี่ยนคุณสมบัติในการละลายของสารโดย เปลี่ยนเป็นเกลือ หรืออนุพันธ์ เปลี่ยนตัวทำละลายชนิดต่างๆ และเปลี่ยนพีเอช (pH) ของตัวทำละลาย

2.7.4 การเหวี่ยง (centrifugation)

เป็นการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันโดยสารเหล่านี้ตกตะกอนในอัตราเร็วที่ต่างกัน เมื่อถูกเหวี่ยง จึงแยกสารออกจากกันได้

2.7.5 อิเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นการแยกสารที่มีประจุโดยการเคลื่อนที่ผ่านสนามแม่เหล็กไฟฟ้า ใช้แยกสารซึ่งแตกตัวให้ประจุโดยสารที่มีประจุจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วตรงข้ามด้วยความเร็วที่ไม่เท่ากัน จึงแยกสารออกจากกันได้ ส่วนสารที่ไม่มีประจุจะไม่เคลื่อนที่ เหมาะสำหรับการใช้แยกโปรตีน และ โพลีแซกคาไรด์

2.7.6 โครมาโทกราฟี (chromatography)

เป็นวิธีการแยกองค์ประกอบต่างๆออกจากกันที่ได้ผลดีมาก และนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัว (distribution of partition) ของสารตัวอย่างระหว่างเฟส 2 เฟสที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งอาจเป็นแก๊ส หรือของเหลวกับอีกเฟสหนึ่งซึ่งเป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) อาจเป็นของแข็ง หรือของเหลวที่ล้อมรอบด้วยวัสดุช่วยพยุง (supporting material) ซึ่งหน้าที่ในการแยกสารหรือองค์ประกอบของสารตัวอย่างออกจากกันขึ้นอยู่กับความจำเพาะของสารตัวอย่างที่มีต่อเฟสอยู่กับที่

เฟสเคลื่อนที่ทำหน้าที่ในการชะล้างหรือพาสารเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ ขณะที่เฟสเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ องค์ประกอบหรือสารชนิดต่างๆ ในสารตัวอย่างจะมีการเคลื่อนที่ผ่านสารเข้าและออกระหว่างเฟสทั้งสองและมีการหน่วงเหนี่ยว (retention) ในเฟสอยู่กับที่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติกายภาพและทางเคมี เช่นปฏิกิริยา (interaction) ระหว่างตัวถูกละลาย กับเฟสเคลื่อนที่ขององค์ประกอบหรือสารแต่ละชนิดที่อยู่ในสารตัวอย่างที่มีความจำเพาะต่อเฟสทั้งสองจากความแตกต่างนี้ทำให้สารแต่ละชนิดที่เคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ในอัตราที่แตกต่างกัน ทำให้มีการแยกเกิดขึ้น ระยะเวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ (retention time) จะแสดงออกมาในรูปตำแหน่งพีก หรือจุดบนโครมาโทแกรม (chromatogram) สามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ (qualitative and quantitative analysis)

ประโยชน์ของการทำโครมาโทกราฟี คือ

- ใช้แยกสารแต่ละชนิดออกจากสารผสม
- ตรวจความสม่ำเสมอ (homologeneity) ของสารตัวอย่าง
- ทำสารให้บริสุทธิ์ (purification)
- ตรวจเอกลักษณ์ของสาร
- ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ (quantitative analysis)
- ตรวจหาสารปนเปื้อน (impurity)

2.7.6.1 เทคนิคโครมาโทรกราฟี

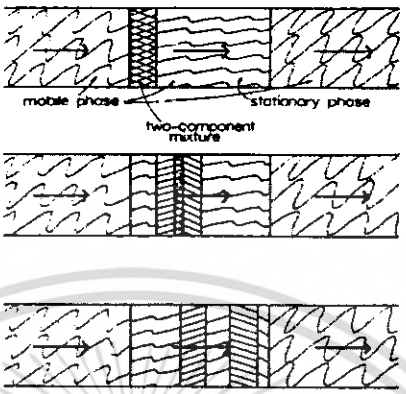
การแยกองค์ประกอบที่สำคัญจากพืชสมุนไพรโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีมีดังนี้

2.7.6.1.1 เปเปอร์โครมาโทกราฟี (Paper Chromatography,PC)

จัดเป็นโครมาโทกราฟีของเหลว (liquid chromatography) ที่ใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ไม่ซับซ้อน โดยมีกระดาษเป็นวัสดุค้ำจุน (supporting material) หรือเป็นแอดซอร์เบนท์ ส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใหญ่กลไกการแยกเกิดพาร์ทิชันมากกว่าการดูดซับ เนื่องจากเส้นใยเซลลูโลส ของกระดาษกรอง จะมีความชื้นเป็นแผ่นฟิล์มอยู่รอบ ๆ ถึงแม้จะอยู่ในสภาพอากาศแห้งก็ตาม



รูปที่ 11 แสดงการแยกสารผสมที่เคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่โดยเฟสเคลื่อนที่ทำหน้าที่เฟสเคลื่อนที่ (Kenkel ,1994)

2.7.6.1 เทคนิคโครมาโทรกราฟี

การแยกองค์ประกอบที่สำคัญจากพืชสมุนไพรโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีมีดังนี้

2.7.6.1.1 เปเปอร์โครมาโทกราฟี (Paper Chromatography,PC)

จัดเป็นโครมาโทกราฟีของเหลว (liquid chromatography) ที่ใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ไม่ซับซ้อน โดยมีกระดาษเป็นวัสดุค้ำจุน (supporting material) หรือเป็นแอดซอร์เบนท์ ส่วนใหญ่กลไกการแยกเกิดพาร์ทิชันมากกว่าการดูดซับ เนื่องจากเส้นใยเซลลูโลส ของกระดาษกรอง จะมีความชื้นเป็นแผ่นฟิล์มอยู่รอบ ๆ ถึงแม้จะอยู่ในสภาพอากาศแห้งก็ตาม

2.7.6.1.2 ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี (Thin Layer Chromatography, TLC)

เป็นเทคนิคที่ไม่เพียงแต่ใช้แยกตรวจสารในปริมาณน้อยๆ (ระดับ ไมโครกรัม μg scale) ได้ด้วย โดยใช้เฟสอยู่กับที่ (ส่วนใหญ่เรียกว่าแอดซอร์เบนท์) แผ่บนแผ่นรองรับ หรือซัพพอร์ทเทอร์ซึ่งทำด้วยแก้วหรืออะลูมิเนียม หรือพอลิเอทอลีน เมื่อหยดสารละลายตัวอย่างซึ่งเป็นสารผสมลงบนแอดซอร์เบนท์เรียบร้อยแล้ว จึงนำแผ่น TLC ใส่ในแท็งก์ซึ่งบรรจุเฟสเคลื่อนที่หรือระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดกระบวนการที่เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่ไปบนเฟสที่อยู่กับที่ ซึ่งเรียกว่า ดีวีลอปเมนท์ (Development) จะเกิดการแยกสารประกอบต่างๆออกจากกันโดยอาศัยกลไกที่กล่าวมาแล้ว

2.7.6.1.3 ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (High Pressure Thin-layer Chromatography,HPTLC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จัดเป็นวิธีใหม่ที่พัฒนาจากวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการหาปริมาณและแยกสารสูงขึ้น โดยใช้ตัวดูดซับที่มีขนาดอนุภาคเล็กลง (2-7 ไมโครมิเตอร์) และมีความแตกต่างของขนาดอนุภาคน้อยมาก ทำให้ทินเลเยอร์ โครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูงนี้ทำได้รวดเร็ว มีความถูกต้อง และความไวมากขึ้นให้ผลการทดลองเที่ยงตรง นอกจากนี้ยังมีเครื่องเดนซิโตมิเตอร์เป็นองค์ประกอบโดยทำหน้าที่เป็นเครื่องตรวจวัด (detector) จึงใช้มากในงานวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญจากพืชสมุนไพร (http://www.vcharkarn.com)

2.7.6.1.4 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography, CC)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารให้ได้ปริมาณมาก โดยเฟสเคลื่อนที่จะทำหน้าที่พาสารเคลื่อนที่ไปบนเฟสอยู่กับที่ซึ่งบรรจุในหลอดแก้วปลายเปิด (open column) จึงเกิดการกระจายตัวของสารระหว่างสองเฟสนี้ โดยใช้กลไกแอดซอพชันโครมาโทกราฟี พาร์ทิชันโครมาโทกราฟี ไอออนเอกซ์เชนโครมาโทกราฟี หรือไซส์เอกซ์คลูชันโครมาโทกราฟี

2.7.6.1.5 แกสโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC)

เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้สำหรับการแยกสารผสมโดยอาศัยเฟสสองเฟส เฟสหนึ่งคือเฟสอยู่กับที่ อาจเป็นของแข็งหรือของเหลวซึ่งจะมีพื้นที่ผิวมาก และอีกเฟสหนึ่งคือเฟสเคลื่อนที่เป็นแก๊ส (หรือเรียกแก๊สพา (carrier gas) ที่ผ่านไปบนเฟสอยู่กับที่ จัดเป็นคอลัมน์โครมาโทกราฟีชนิดหนึ่ง สารที่แยกด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีมักเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ต้องเป็นสารที่มีความดันไอสูง สามารถเปลี่ยนเป็นแก๊สได้ที่อุณหภูมิหนึ่ง (ไม่เกิน 450 องศาเซลเซียส) ถ้าคุณสมบัติของสารใดที่ไม่เหมาะสมที่ใช้ในการแยก เช่น ระเหยยาก หรือมีความคงตัวต่ำ ถูกทำลายเมื่อเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์หรือ สารมีขั้วสูงเกินไป เมื่อเข้าไปอยู่ในเฟสอยู่กับที่ ทำให้ยากต่อการชะให้เคลื่อนตัวออกจากคอลัมน์ เป็นต้น จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคการสร้างอนุพันธ์ (derivatizing technique) เข้าช่วย เพื่อเปลี่ยนแปลงสูตรโครสร้างของสารนั้นให้มีคุณสมบัติตามต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี

3.1.1 เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95

3.1.2 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

3.1.3 Sodium Chloride (NaCl)

3.1.4 Hexane (C_6H_{14})

3.1.5 Ethanol (CH_3OH)

3.1.6 Mueller Hinton agar (MHA)

3.1.7 Sabouraud dextrose agar (SDA)

3.1.8 0.048M Barium chloride ($BaCl_2$)

3.1.9 0.36M Sulfuric acid (H_2SO_4)

3.1.10 Ethyl acetate ($C_4H_8O_2$)

3.1.11 Dichloromethane (CH_2Cl_2)

3.1.12 Penicillin G

3.1.13 Amphotericin B

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

3.2.2 เครื่องปั่น (blender)

3.2.3 เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (balance)

3.2.4 ชุดกรองสุญญากาศ

3.2.5 เครื่องระเหยระบบสุญญากาศ (Rotary evaporator)

3.2.6 เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลองทั่วไป

3.2.7 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.2.8 ชุดถิ่วเวดพลาสติก

3.2.9 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

3.2.10 ตู้เขี่ยเชื้อแบบลมเป่า (Laminar air flow)

3.2.11 กรวยแยก

3.2.12 แผ่นทดสอบ (Paper disc)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.13 กระดาษกรอง What man No.1

3.2.14 UV chamber

3.2.15 ปากคีบ (Forceps)

3.2.16 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

3.2.17 ไม้พันสำลี

3.2.18 ทิป (Tip)

3.2.19 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.2.20 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

3.2.21 แผ่น TLC (Thin layer chromatography)

3.2.22 คอลัมน์โครมาโตกราฟฟี (Column chromatography)

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบฤทธิ์ของสิ่งสกัดหยาบ

3.3.1	*Escherichia coli*	ATCC 25922
3.3.2	*Pseudomonas aeruginosa*	ATCC 27853
3.3.3	*Candida albicans*	ATCC 10231
3.3.4	*Bacillus subtilis*	ATCC 6635
3.3.5	*Micrococcus luteus*	ATCC 9341
3.3.6	*Staphylococcus aureus*	ATCC 25923

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเตรียมตัวอย่างพืชแห้ง

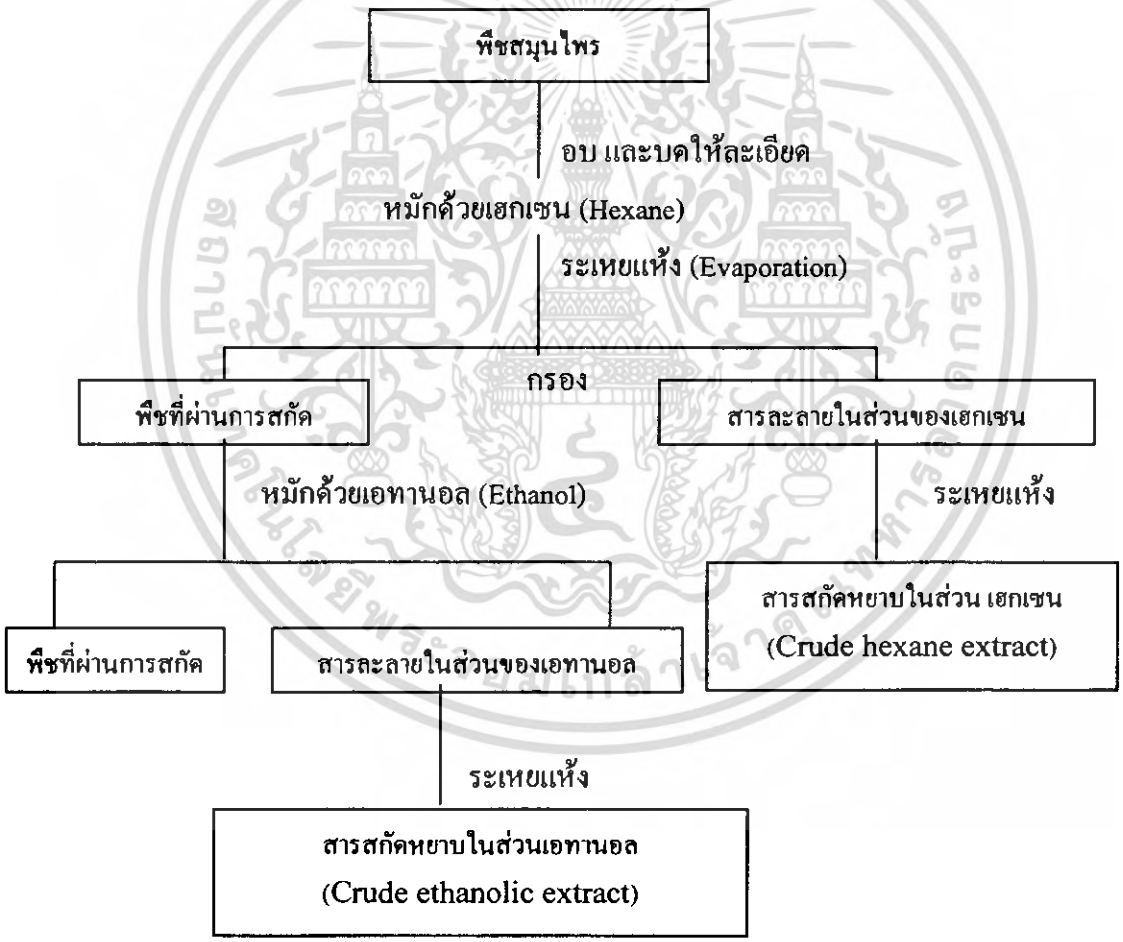
นำส่วนที่ทำการทดสอบของไม้ไทยทั้งหมด 3 ชนิดคือ ส่วนใบของเขี้ยวกระแต *(Psilanthus bengalensis* (Roem.& Schult) J. Leroy) 0.8 กิโลกรัม ส่วนใบของต้นผกากรอง (*Lantana camara* Linn.) 2 กิโลกรัม และส่วนเปลือกของต้นสารภี (*Mammea Siamensis* Kosterm) 2 กิโลกรัมนำไปทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนของพืชที่แห้งไปบดย่อยให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (blender) และชั่งน้ำหนักหลังอบ

3.4.2 การสกัดสิ่งสกัดหยาบจากพืช เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำพืชแห้งที่บดแล้วหมัก (maccrate) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เฮกเซน ทำการกวนให้ตัวอย่างสัมผัสกับตัวทำละลายอย่างสม่ำเสมอ หมักเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นกรองแยกส่วนที่เป็นของแข็งออกด้วยกระดาษกรอง whatman No.1 โดยใช้ชุดเครื่องกรองชนิดลดความดัน จะได้สารสกัดในส่วนของเฮกเซน และ กากที่เหลือจากการกรอง จากนั้นนำสารละลายในส่วนของเฮกเซนไปทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) ที่ความเร็วรอบ 90 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดหยาบในส่วนของเฮกเซนที่เข้มข้น (crude hexane extract) ส่วนกากพืชที่ผ่านการกรองมาทำการสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ กรองแยกส่วนที่เป็นของแข็งออกด้วยกระดาษกรอง whatman No.1 โดยใช้ชุดเครื่องกรองชนิดลดความดัน จะได้สารสกัดในส่วนของเอทานอล นำสารสกัดในส่วนของเอทานอลที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) ที่ความเร็วรอบ 90 รอบ/นาทีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบในส่วนเอทานอลที่เข้มข้น (crude ethanolic extracts) และนำไปทดสอบเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (หัวข้อ 3.4.3) ต่อไป



รูปที่ 12 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.4.3.1 การตรวจสอบสารโดย Bioautographic Method (กุสุมา, 2543)

นำสารสกัดหยาบในส่วนเอทานอล และสารสกัดหยาบในส่วนเฮกเซนที่สกัดได้ของพืชทั้ง 3 ชนิด มาละลายในเอทานอลความเข้มข้น 95% ให้มีความเข้มข้นของสาร 1 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่น TLC (thin layer chromatography) โดยใช้เฟสคงที่ (stationary phase) ซึ่งทำด้วย ซิลิกาเจล (silica gel) จากนั้นทำการหาระบบตัวทำละลาย (solvent system) โดยผสมตัวทำละลายอินทรีย์ในอัตราส่วนที่เหมาะสมกับสารสกัดเพื่อเป็นตัวทำละลายที่เคลื่อนที่ (mobile phase) จากนั้นนำสารสกัดตัวอย่างที่หยด (spot) ลงบนแผ่น TLC แล้วจุ่มลงในระบบตัวทำละลาย (develop) ที่ใช้ และตรวจสอบการแยกของสารภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่นแสงที่ 254 นาโนเมตร และ 365 นาโนเมตร จากนั้นเตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA) และ Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) สำหรับเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ตามลำดับ ทำการทาเชื้อทดสอบ (swab) ทั้ง 5 ชนิดลงบนจานอาหาร จากนั้น นำแผ่น TLC ที่ได้ แล้ววางทาบลงบนผิวหน้าจานอาหารของเชื้อทั้ง 5 ชนิด สังเกตผลโดยสังเกตจากวงใสที่เกิดขึ้นรอบๆบริเวณจุด (spot)

3.4.3.2 การทดสอบสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial Activity)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Agar Disc Diffusion (Lorian, 1980) โดยเชื้อที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยมีวิธีการทดสอบ คือ เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง Mueller-Hinton Agar (MHA) และ Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) สำหรับเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ นำเชื้อที่ใช้ทดสอบผสมกับน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ normal salt saline 0.85% ปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 (ความขุ่นนี้จะมีจำนวนเซลล์ประมาณ $1x10^8$CFU/mL) ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มเชื้อแขวนลอยที่เจือจางไว้ทา (swab) ลงอาหารแข็งด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นนำแผ่นทดสอบ (disc) ที่หยดสารละลายที่ระดับความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 62.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากสารสกัดหยาบของพืชที่ต้องการทดสอบปริมาณ 20 ไมโคลิตรต่อแผ่นทดสอบ ทิ้งไว้ให้แห้งแล้ววางลงบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อทดสอบอยู่ และทำแผ่นทดสอบควบคุม (control) โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัดหยาบเป็นชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) และใช้สารปฏิชีวนะ แอมโฟเทอราซิน บี (Amphoteracin B) และ เพนนิซลลินจี (Penicillin G) เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อยีสต์และแบคทีเรีย ตามลำดับเป็นเวลา 1- 2 วัน ตรวจผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญ (clear zone) เปรียบเทียบกับแผ่นทดสอบชุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควบคุม (negative และ positive) ซึ่งแสดงความสามารถของสิ่งสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด

3.4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.4.4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น (TLC Screening Assay) (Takao และคณะ,1994)

นำแผ่น TLC ที่ผ่านการ developed ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วจุ่มลงไปในสารละลาย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้นร้อยละ 2 ในเอทานอล นำขึ้นมาแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำออกมาตรวจสอบโดยจะเห็นเป็นแถบสีเหลืองภายใต้พื้นสีม่วงเมื่อสารตัวอย่างมีการทำปฏิกิริยากับ DPPH

3.4.4.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Free Radical Scavenging Activity Assay (Braca และคณะ, 2002)

1.) การเตรียมสารละลาย DPPH (200 ไมโครโมล)

ชั่ง DPPH 1.6 มิลลิกรัมละลายในเมทานอล 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ผสมให้เข้ากันโดยใช้คลื่นเสียง (Sonicate) เป็นเวลา 30 นาที จะได้สาละลายDPPH ที่มีความเข้มข้น 200 ไมโครโมล ควรเก็บไว้ให้พ้นแสง

2.) ขั้นตอนการดำเนินการ

นำสารสกัดหยาบในส่วนเอทานอล และสารสกัดหยาบในส่วนเฮกเซนที่สกัดได้ของพืชทั้ง 3 ชนิดจากข้อ 3.4.2 เจือจางในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ให้มีความเข้มข้นของสาร 10 ระดับได้แก่ $5x10^{-1}$, $5x10^{-2}$, $5x10^{-3}$, $5x10^{-4}$, $5x10^{-5}$, $5x10^{-6}$, $5x10^{-7}$, $5x10^{-8}$, $5x10^{-9}$ และ $5x10^{-10}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล ปริมาตร 180 ไมโครลิตรลงใน ควิเวต เขย่าสารละลายที่ได้แล้วตั้งไว้ในที่มืดอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ quercetin เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) และสารละลายเอทานอลเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) รายงานผลที่ได้เป็น ค่าการดูดกลืนแสงต่อไมโครโมลของตัวอย่าง จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับผลของตัวควบคุมเชิงบวก (positive control)

3.) การคำนวณร้อยละของปฏิกิริยาดักจับอนุมูลอิสระ (Free Radical Scavenging)

ร้อยละของปฏิกิริยาดักจับอนุมูลอิสระทำการคำนวณ ดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ DPPH reduction} = [(A-B)/A] \times 100$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร หลังจากทำการบ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

B = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่นำมาทำปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรหลังจากทำการบ่ม

สำหรับการประเมินค่า IC_{50} ของสารที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทำได้โดยเขียนกราฟ ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบเทียบกับ % DPPH reduction ที่ได้จากการคำนวณ จากนั้นจะหาค่า IC_{50} ได้เมื่อวิเคราะห์จากกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 สารสกัดหยาบจากไม้ไทยที่ใช้ในการทดลอง

สารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดลอง ได้จากไม้ไทย 3 ชนิด จาก อำเภอเมืองนครนายก จังหวัดนครนายก โดยนำไม้ไทยทั้ง 3 ชนิด ผ่านกระบวนการอบแห้งและบดให้เป็นผง นำมาสกัดโดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ทำให้สารสกัดหยาบเข้มข้นโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบเข้มข้นของไม้ไทยแต่ละชนิด จากนั้นนำมาทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับขั้ว โดยไม้ไทยที่ใช้ในการทดลองคือ

4.1.1 ผกากรอง

4.1.2 สารภี

4.1.3 เขี้ยวกระแต

4.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากไม้ไทย

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากไม้ไทยแต่ละชนิด ได้แก่ ผกากรอง สารภี และเขี้ยวกระแต มาทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับขั้ว จะได้สารสกัดหยาบในส่วนต่าง ๆ คือ สารสกัดหยาบในชั้นเมทานอลและสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน จากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 5 ระดับความเข้มข้น ดังนี้

ระดับความเข้มข้นที่ 1	คือ	50	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ระดับความเข้มข้นที่ 2	คือ	25	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ระดับความเข้มข้นที่ 3	คือ	12.5	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ระดับความเข้มข้นที่ 4	คือ	6.25	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ระดับความเข้มข้นที่ 5	คือ	3.125	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.1 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบจากผกากรอง

เมื่อนำสารสกัดหยาบของผกากรองที่สกัดโดยตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับขั้ว พบว่าสารสกัดหยาบของผกากรองในชั้นเฮกเซน แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ดังแสดงในตารางที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากสิ่งสกัดหยาบของผงกรอง

สิ่งสกัดหยาบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มม.)					
	B. subtilis	*S. aureus*	*M. luteus*	*E. coli*	*Ps. aeruginosa*	*C. albicans*
ชั้นเอทานอล						
PE-1(50 mg/mL)	-	-	-	-	-	-
PE-2(25mg/mL)	-	-	-	-	-	-
PE-3(12.5mg/mL)	-	-	-	-	-	-
PE-4(6.25mg/mL)	-	-	-	-	-	-
PE-5(3.125mg/mL)	-	-	-	-	-	-
ชั้นเฮกเซน						
PH-1(50mg/mL)	10	14	21	-	-	-
PH-2(25mg/mL)	9	10	14	-	-	-
PH-3(12.5mg/mL)	8	9	13	-	-	-
PH-4(6.25mg/mL)	7	7	11.5	-	-	-
PH-5(3.125mg/mL)	-	-	9	-	-	-
ชุดควบคุมเชิงบวก						
PenG-1(50mg/mL)	8	35	47	12	-	-
PenG-2(25mg/mL)	7	24	38	10	-	-
PenG-3(12.5mg/mL)	6.5	23	35	9	-	-
PenG-4(6.25mg/mL)	-	20	32	-	-	-
PenG5(3.125mg/mL)	-	18	30	-	-	-
PenG-6(4 mg/mL)	-	25	34	-	-	-
AmB(50mg/mL)	-	-	-	-	-	18
ชุดควบคุมเชิงลบ						
hexane	-	-	-	-	-	-
methanol	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ

PE	:	สารสกัดหยาบของผงกากรองในชั้นเอทานอล
PH	:	สารสกัดหยาบของผงกากรองในชั้นเฮกเซน
PenG	:	Penicillin G
AmB	:	Amphotericin B
ชุดควบคุมเชิงบวก	:	ยาปฏิชีวนะ Penicillin G และ Amphotericin B
ชุดควบคุมเชิงลบ	:	Methanol และ Hexane
อาหารที่ใช้เลี้ยง	:	Mueller Hinton Agar และ Sabouraud's Dextrose Agar สำหรับเชื้อ แบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ
สภาวะที่ใช้ทดลอง	:	บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ 30 องซาเซลเซียส

รูปที่ 13 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 โดยสารสกัดหยาบของผงกากรองในชั้นเฮกเซน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 14 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยสารสกัดหยาบของผลกากรองในชั้นเฮกเซน

รูปที่ 15 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 โดยสารสกัดหยาบของผลกากรองในชั้นเฮกเซน

4.2.2 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากสารภี

เมื่อนำสารสกัดหยาบของสารภีที่สกัดโดยตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับขั้ว พบว่าสารสกัดหยาบของสารภีในชั้นเฮกเซนแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 โดยที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่าการยับยั้งเทียบเท่ากับ เพนิซิลิน จี ซึ่งใช้เป็น possitive control ดังแสดงในตารางที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากสิ่งสกัดหยาบของสารภี

สิ่งสกัดหยาบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มม.)					
	B.subtilis	*S. aureus*	*M. luteus*	*E. coli*	*Ps. aeruginosa*	*C. albicans*
ชั้นเอทานอล						
SE-1(50 mg/mL)	9	-	-	-	-	-
SE-2(25mg/mL)	8	-	-	-	-	-
SE-3(12.5mg/mL)	6.5	-	-	-	-	-
SE-4(6.25mg/mL)	-	-	-	-	-	-
SE-5(3.125mg/mL)	-	-	-	-	-	-
ชั้นเฮกเซน						
SH-1(50mg/mL)	15	25	32	-	-	-
SH-2(25mg/mL)	14	23	32	-	-	-
SH-3(12.5mg/mL)	13	19	27	-	-	-
SH-4(6.25mg/mL)	12.5	17	23	-	-	-
SH-5(3.125mg/mL)	9	15	19.5	-	-	-
ชุดควบคุมเชิงบวก						
PenG-1(50mg/mL)	8	35	47	12	-	-
PenG-2(25mg/mL)	7	24	38	10	-	-
PenG-3(12.5mg/mL)	6.5	23	35	9	-	-
PenG-4(6.25mg/mL)	-	20	32	-	-	-
PenG-5(3.125mg/mL)	-	18	30	-	-	-
PenG-6(4 mg/mL)	-	25	34	-	-	-
AmB(50mg/mL)	-	-	-	-	-	18
ชุดควบคุมเชิงลบ						
hexane	-	-	-	-	-	-
methanol	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ

SE	:	สารสกัดหยาบของสารภีในชั้นเอทานอล
SH	:	สารสกัดหยาบของสารภีในชั้นเฮกเซน
PenG	:	Penicillin G
AmB	:	Amphotericin B
ชุดควบคุมเชิงบวก	:	ยาปฏิชีวนะ Penicillin G และ Amphotericin B
ชุดควบคุมเชิงลบ	:	Methanol และ Hexane
อาหารที่ใช้เลี้ยง	:	Mueller Hinton Agar และ Sabouraud's Dextrose Agar สำหรับเชื้อ แบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ
สภาวะที่ใช้ทดลอง	:	บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ 30 องซาเซลเซียส

รูปที่ 16 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยสารสกัดหยาบของสารภีในชั้นเฮกเซน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 17 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 โดยสารสกัดหยาบของสารภีในชั้นเฮกเซน

รูปที่ 18 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 โดยสารสกัดหยาบของสารภีในชั้นเฮกเซน

4.2.3 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากเขี้ยวกระแต

เมื่อนำสิ่งสกัดหยาบของเขี้ยวกระแตที่สกัดโดยตัวทำละลายอินทรีย์พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทานอลแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ดังแสดงในตารางที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากสิ่งสกัดหยาบของเขี้ยวกระแต

สิ่งสกัดหยาบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มม.)					
	B. subtilis	*S. aureus*	*M. luteus*	*E. coli*	*Ps. aeruginosa*	*C. albicans*
ชั้นเอทานอล						
KE-1(50 mg/mL)	-	-	-	-	15	-
KE-2(25mg/mL)	-	-	-	-	13	-
KE-3(12.5mg/mL)	-	-	-	-	12	-
KE-4(6.25mg/mL)	-	-	-	-	12	-
KE-5(3.125mg/mL)	-	-	-	-	11	-
ชั้นเฮกเซน						
KH-1(50mg/mL)	-	-	-	-	-	-
KH-2(25mg/mL)	-	-	-	-	-	-
KH-3(12.5mg/mL)	-	-	-	-	-	-
KH-4(6.25mg/mL)	-	-	-	-	-	-
KH-5(3.125mg/mL)	-	-	-	-	-	-
ชุดควบคุมเชิงบวก						
PenG-1(50mg/mL)	8	35	47	12	-	-
PenG-2(25mg/mL)	7	24	38	10	-	-
PenG-3(12.5mg/mL)	6.5	23	35	9	-	-
PenG-4(6.25mg/mL)	-	20	32	-	-	-
PenG-5(3.125mg/mL)	-	18	30	-	-	-
PenG-6(4 mg/mL)	-	25	34	-	-	-
AmB(50mg/mL)	-	-	-	-	-	18
ชุดควบคุมเชิงลบ						
hexane	-	-	-	-	-	-
methanol	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ

KE	:	สารสกัดหยาบของเขี้ยวกระแตในชั้นเอทานอล
KH	:	สารสกัดหยาบของเขี้ยวกระแตในชั้นเฮกเซน
PenG	:	Penicillin G
AmB	:	Amphotericin B
ชุดควบคุมเชิงบวก	:	ยาปฏิชีวนะ Penicillin G และ Amphotericin B
ชุดควบคุมเชิงลบ	:	Methanol และ Hexane
อาหารที่ใช้เลี้ยง	:	Mueller Hinton Agar และ Sabouraud's Dextrose Agar สำหรับเชื้อ แบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ
สภาวะที่ใช้ทดลอง	:	บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ 30 องซาเซลเซียส

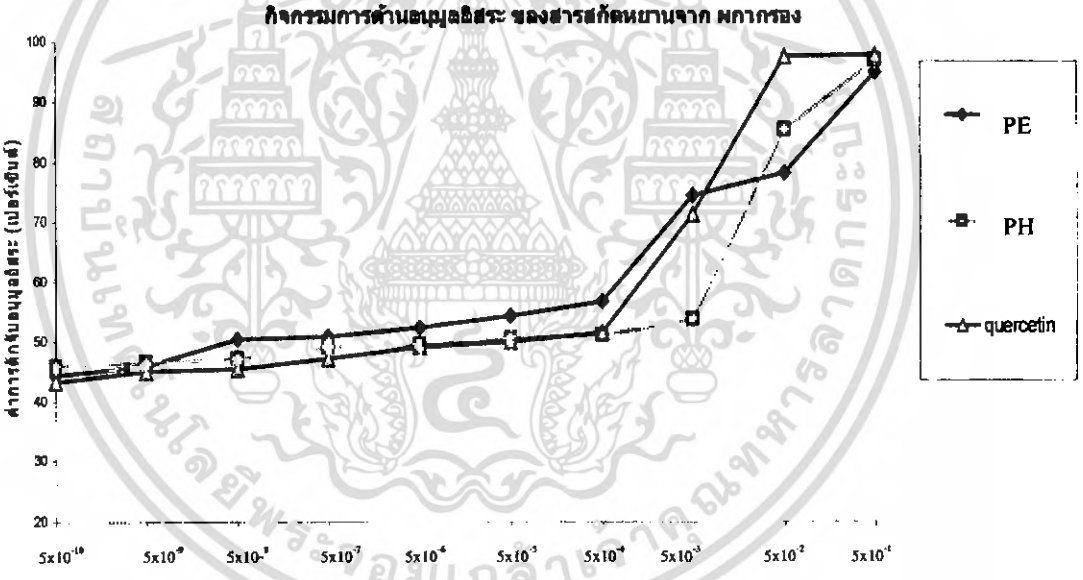
รูปที่ 19 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 โดยสารสกัดหยาบของเขี้ยวกระแตในชั้นเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH Radical Scavenging (Bracaและคณะ, 2002) (Middleton, 2005)

4.3.1 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผากรอง

เมื่อนำสารสกัดหยาบของ ผากรองมาทำการสกัดโดยตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับความเป็นขั้ว ได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทานอล และเฮกเซน จากนั้นนำมาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีการดักจับอนุมูลอิสระของ DPPH (DPPH Radical Scavenging method) เมื่อวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง 2800a uv/vis spectophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร พบว่าสารสกัดหยาบของผากรองในชั้นเอทานอลและเฮกเซนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่า quercetin ซึ่งใช้เป็น positive control โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $5x10^{-8}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ $2.75x10^{-5}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ขณะที่ quercetin มีค่า IC_{50} เท่ากับ $5x10^{-5}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 20

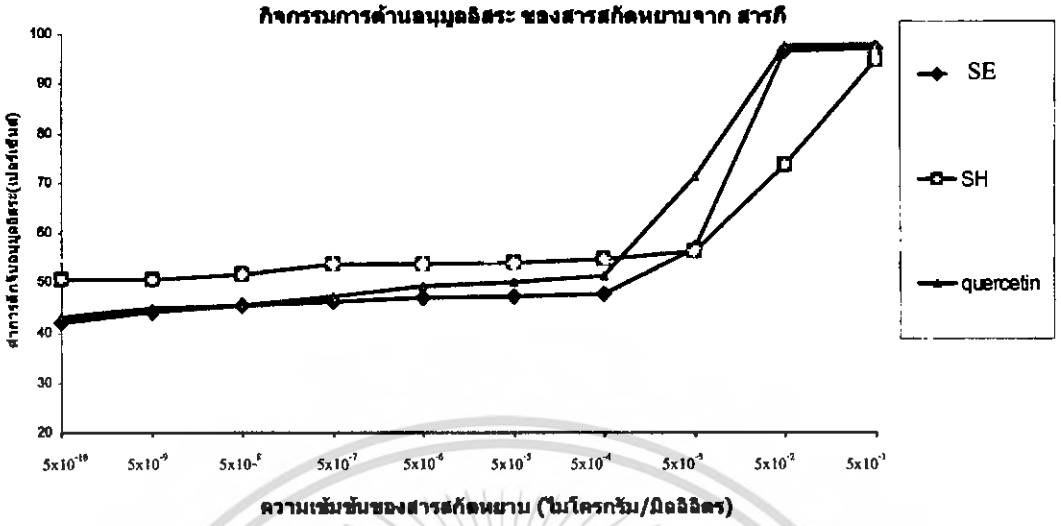


รูปที่ 20 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากผากรองในชั้นเอทานอล และ ชั้นเฮกเซน เมื่อเปรียบเทียบกับ quercetin ซึ่งเป็น positive control

4.3.2 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารภี

สารสกัดหยาบจากสารภีในชั้นเฮกเซนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า quercetin ซึ่งเป็น positive control โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $5x10^{-10}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดหยาบจากสารภีในชั้นเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำกว่า quercetin ซึ่งใช้เป็น positive control โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $1.375x10^{-3}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 2I

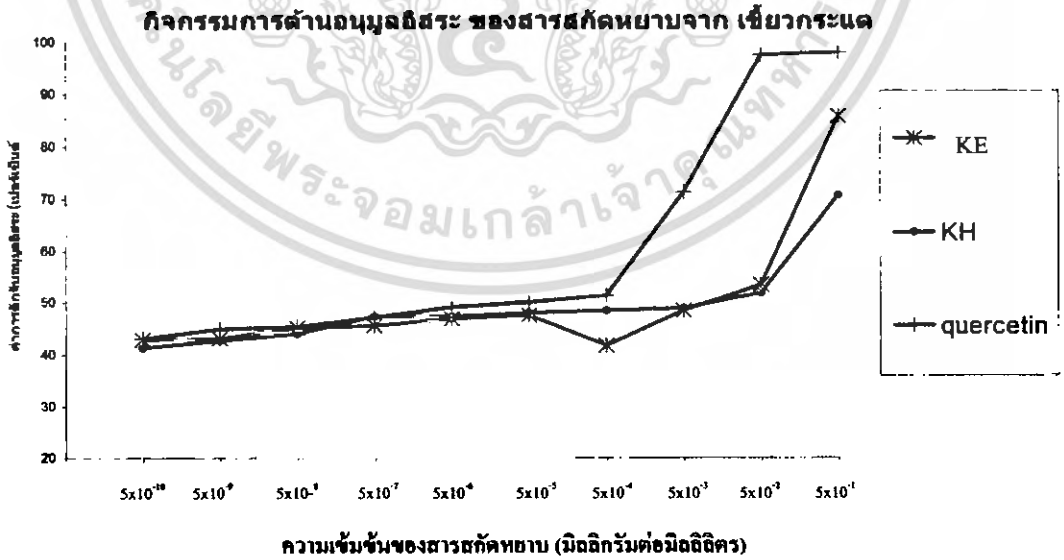
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 21 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสารภีในชั้นเอทานอลและเฮกเซน เมื่อเปรียบเทียบกับ quercetin ซึ่งเป็น positive control

4.3.3 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเขี้ยวกระแต

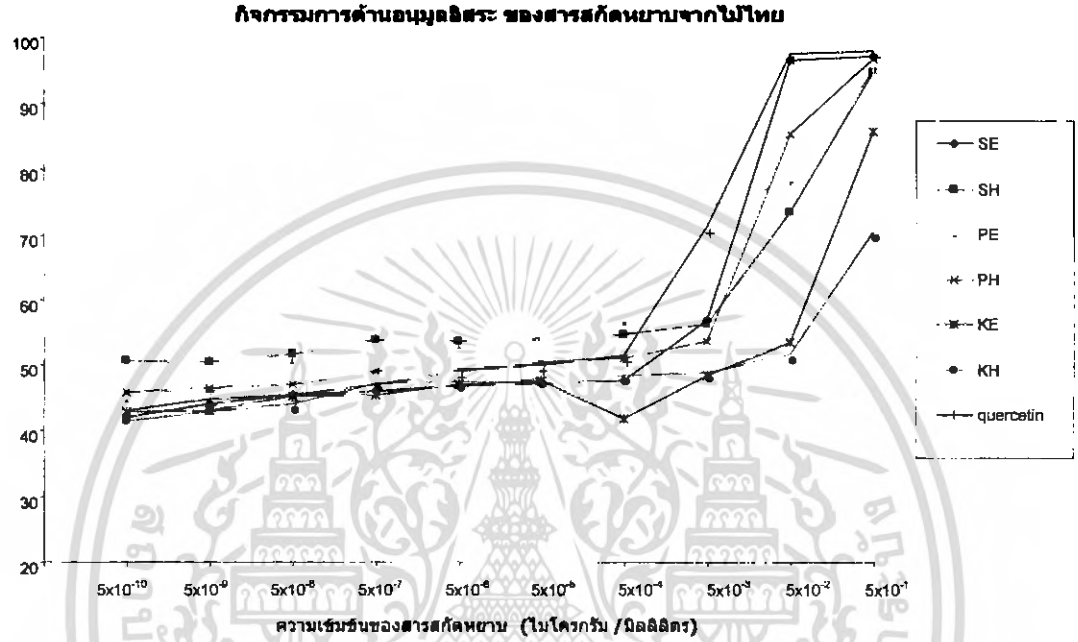
สารสกัดหยาบจากเขี้ยวกระแตในชั้นเอทานอลและชั้นเฮกเซนมีฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำกว่า quercetin ซึ่งใช้เป็น positive control โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $1.375x10^{-2}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ $1.833x10^{-2}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 22



รูปที่ 22 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเขี้ยวกระแตในชั้นเอทานอล และชั้นเฮกเซน เมื่อเปรียบเทียบกับ quercetin ซึ่งเป็น positive control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของไม้ไทยทั้ง 3 ชนิดแสดงในรูปของค่า IC_{50} (Inhibition concentration) หรือค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ที่มีอยู่ในสารสกัดที่จำเป็นต้องใช้ในการลดความเข้มข้นของ DPPH เริ่มต้นลง 50 เปอร์เซ็นต์ (Molyneux, 2003) ซึ่งสามารถหาได้จากกราฟ



รูปที่ 23 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ จากสารสกัดหยาบจากไม้ไทย 3 ชนิด ในการต้านอนุมูลอิสระของสารละลาย DPPH ; SE = สารสกัดหยาบส่วนเอทานอลจากเปลือกต้นสารภี; SH = สารสกัดหยาบส่วนเฮกเซนจากเปลือกต้นสารภี; PE = สารสกัดหยาบส่วนเอทานอลจากใบผกากรอง; PH = สารสกัดหยาบส่วนเฮกเซนจากใบผกากรอง; KE = สารสกัดหยาบส่วนเอทานอลจากใบเขี้ยวกระแต; KH = สารสกัดหยาบส่วนเฮกเซนจากใบเขี้ยวกระแต; quercetin = สารต้านอนุมูลอิสระบริสุทธิ์นำมาใช้เป็น positive control

เมื่อพิจารณาค่า IC_{50} พบว่าสารสกัดหยาบของสารภีในชั้นเฮกเซน แสดงฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด มีค่า IC_{50} ที่ระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง โดยที่ความเข้มข้น $5x10^{-10}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่น้อยที่สุดในการทดลองพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูลอิสระได้สูงถึงร้อยละ 50.687 รองมาเป็น สารสกัดหยาบของผกากรองในชั้นเฮกเซน สารสกัดหยาบของสารภีในชั้นเอทานอล สารสกัดหยาบของเขี้ยวกระแตในชั้นเอทานอล และสารสกัดหยาบของเขี้ยวกระแตในชั้นเฮกเซน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระบริสุทธิ์อย่าง quercetin ที่ใช้เป็น positive

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

control พบว่า Quercetin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารสกัดหยาบของสารภีในชั้นเฮกเซน โดยที่ Quercetin มีค่า IC_{50} เท่ากับ $5x10^{-5}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า IC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำกว่าบ่งชี้ถึงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่มากนั้นเอง (Brand-Williams และ คณะ, 1995)

ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบจากสารภี

ส่วนของสารสกัด/ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร			% DPPH reduction
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	เฉลี่ย	
ส่วนเอทานอล				
$5x10^{-1}$	0.076	0.083	0.080	97.195
$5x10^{-2}$	0.096	0.099	0.098	96.550
$5x10^{-3}$	1.167	1.273	1.220	56.966
$5x10^{-4}$	1.452	1.520	1.486	47.583
$5x10^{-5}$	1.467	1.523	1.495	47.265
$5x10^{-6}$	1.484	1.526	1.505	46.913
$5x10^{-7}$	1.497	1.560	1.529	46.084
$5x10^{-8}$	1.512	1.581	1.547	45.446
$5x10^{-9}$	1.585	1.585	1.585	44.091
$5x10^{-10}$	1.670	1.617	1.644	42.017
ส่วนเฮกเซน				
$5x10^{-1}$	0.105	0.194	0.150	94.734
$5x10^{-2}$	0.702	0.802	0.752	73.512
$5x10^{-3}$	1.195	1.284	1.240	56.340
$5x10^{-4}$	1.256	1.316	1.286	54.702
$5x10^{-5}$	1.279	1.339	1.309	53.892
$5x10^{-6}$	1.287	1.342	1.315	53.698
$5x10^{-7}$	1.273	1.350	1.312	53.804
$5x10^{-8}$	1.371	1.378	1.375	51.585
$5x10^{-9}$	1.397	1.387	1.392	50.969
$5x10^{-10}$	1.401	1.399	1.400	50.687

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบจากผลกรอง

ส่วนของสารสกัด/ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ครั้งที่1	ครั้งที่2	เฉลี่ย	% DPPH reduction
ส่วนเอทานอล				
$5x10^{-1}$	0.077	0.087	0.082	96.875
$5x10^{-2}$	0.490	0.280	0.385	85.328
$5x10^{-3}$	1.232	1.200	1.216	53.659
$5x10^{-4}$	1.274	1.298	1.286	50.991
$5x10^{-5}$	1.289	1.306	1.298	50.553
$5x10^{-6}$	1.337	1.314	1.326	49.486
$5x10^{-7}$	1.356	1.320	1.338	49.009
$5x10^{-8}$	1.389	1.389	1.389	47.066
$5x10^{-9}$	1.411	1.339	1.375	46.456
$5x10^{-10}$	1.418	1.423	1.421	45.865
ส่วนเฮกเซน				
$5x10^{-1}$	0.142	0.138	0.140	95.060
$5x10^{-2}$	0.644	0.599	0.622	78.070
$5x10^{-3}$	0.742	0.712	0.727	74.347
$5x10^{-4}$	1.248	1.211	1.230	56.616
$5x10^{-5}$	1.299	1.288	1.294	54.358
$5x10^{-6}$	1.382	1.317	1.350	52.382
$5x10^{-7}$	1.388	1.400	1.394	50.812
$5x10^{-8}$	1.401	1.409	1.405	50.423
$5x10^{-9}$	1.522	1.552	1.537	45.766
$5x10^{-10}$	1.589	1.567	1.578	44.319

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบจากเชื้อราเขี้ยวกระแต

ส่วนของสารสกัด/ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร			% DPPH reduction
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	เฉลี่ย	
ส่วนเอทานอล				
$5x10^{-1}$	0.384	0.211	0.298	85.752
$5x10^{-2}$	0.949	0.997	0.973	53.4
$5x10^{-3}$	1.065	1.088	1.077	48.443
$5x10^{-4}$	1.318	1.107	1.213	41.93
$5x10^{-5}$	1.075	1.111	1.093	47.653
$5x10^{-6}$	1.09	1.121	1.106	47.055
$5x10^{-7}$	1.118	1.157	1.138	45.522
$5x10^{-8}$	1.12	1.168	1.144	45.211
$5x10^{-9}$	1.205	1.17	1.188	43.127
$5x10^{-10}$	1.207	1.177	1.192	42.912
ส่วนเฮกเซน				
$5x10^{-1}$	0.681	0.551	0.616	70.498
$5x10^{-2}$	1.006	1.008	1.007	51.772
$5x10^{-3}$	1.07	1.061	1.066	48.97
$5x10^{-4}$	1.071	1.079	1.075	48.515
$5x10^{-5}$	1.086	1.082	1.084	48.084
$5x10^{-6}$	1.095	1.099	1.097	47.462
$5x10^{-7}$	1.098	1.102	1.100	47.318
$5x10^{-8}$	1.117	1.219	1.168	44.061
$5x10^{-9}$	1.118	1.269	1.194	42.84
$5x10^{-10}$	1.125	1.321	1.223	41.427

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของ Quercetin

ความเข้มข้น *Quercetin* (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร			% DPPH reduction
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	เฉลี่ย	
$5x10^{-1}$	0.067	0.052	0.060	97.900
$5x10^{-2}$	0.070	0.065	0.068	97.650
$5x10^{-3}$	0.835	0.79	0.813	71.340
$5x10^{-4}$	1.496	1.26	1.378	51.390
$5x10^{-5}$	1.539	1.297	1.418	49.982
$5x10^{-6}$	1.556	1.343	1.450	49.170
$5x10^{-7}$	1.603	1.396	1.500	47.107
$5x10^{-8}$	1.608	1.487	1.548	45.367
$5x10^{-9}$	1.617	1.518	1.568	44.867
$5x10^{-10}$	1.618	1.607	1.613	43.121

ตารางที่ 9 ค่า IC_{50} ของ สารสกัดส่วนของเฮกเซน และ ส่วนของเอทานอลของ สารภี ผกากรอง และ เขี้ยวกระแต

Sample	IC_{50} (mg/ml)
ส่วนของเอทานอล	
สารภี	$1.375x10^{-3}$
ผกากรอง	$5x10^{-8}$
เขี้ยวกระแต	$1.375x10^{-2}$
ส่วนของเฮกเซน	
สารภี	$5x10^{-10}$
ผกากรอง	$2.75x10^{-5}$
เขี้ยวกระแต	$1.833x10^{-2}$
Quercetin	$5x10^{-5}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองเมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของไม้ไทยทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ผกากรอง สารภี และเขี้ยวกระแต ด้วยวิธี Agar Disc Diffussion โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด คือ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 พบว่า สารสกัดหยาบของผกากรองในชั้นเฮกเซนแสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 มากที่สุด รองลงมาคือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรา ส่วนสารสกัดหยาบในชั้นเอทานอลไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ สารสกัดหยาบของสารภีในชั้นเอทานอลไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ส่วนสารสกัดหยาบของสารภีในชั้นเฮกเซนแสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 มากที่สุด รองลงมาคือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบของเขี้ยวกระแตในชั้นเอทานอลแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ส่วนสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ และจากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบของสารภีในชั้นเฮกเซนมีความน่าสนใจที่สุด เนื่องจากแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพดี โดยเทียบกับชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) นอกจากนี้ยังได้ทราบข้อมูลใหม่ว่าสารสกัดหยาบของเขี้ยวกระแตในชั้นเอทานอลแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 โดยเป็นการยับยั้งอย่างจำเพาะ เนื่องจากไม่มีฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบตัวอื่นเลย

จากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของไม้ไทยทั้ง 3 ชนิดโดยวิธีการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH Radical Scavenging method) เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร สารสกัดหยาบของไม้ไทยทั้ง 3 ชนิด แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในรูปค่า IC_{50} พบว่าสารสกัดหยาบของสารภีในชั้นเฮกเซนแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $5x10^{-10}$ มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดหยาบของผกากรองในชั้นเอทานอลและเฮกเซนแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ที่ระดับค่า IC_{50} เท่ากับ $5x10^{-8}$ และ $2.75 x10^{-5}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ quercetin ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวกแสดงค่า IC_{50} ที่ $5 x10^{-5}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นว่าสารสกัดหยาบของไม้ไทยทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์มีฤทธิ์ดีกว่าตัวควบคุมเชิงบวกที่ใช้ในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองเมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียและการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดหยาบของสารภีในส่วนเฮกเซน และสารสกัดหยาบของผกากรองในส่วนเอทานอลและเฮกเซน มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียและอนุมูลอิสระที่ดี ดังนั้น จึงควรมีการนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิจศิริ เรืองรังสี และพะยอม ตันวิวัฒน์. 2544. พืชสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

บุญชู ศรีตุลารักษ์. 2545. สารฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากหาดหนุนและจั่น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. การตรวจสอบและการสกัดสาระสำคัญจากสมุนไพร. กรุงเทพ ฯ : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วันดี กฤษณพันธ์. 2529. พฤกษเคมีเบื้องต้น (Introduction to Phytochemistry). ใน วันดี กฤษณพันธ์ (บรรณาธิการ). เภสัชวินิจฉัย. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 1. หน้า 37-100. กรุงเทพ ฯ : Text & Corporation Co., Ltd.

วีณา อรัจฉริยากูล. 2537. ประวัติและพัฒนาการของสมุนไพรที่ใช้ในการต่อต้านจุลชีพ. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ศรีจันทร์ พรจิราศิลป์. 2546. สารต้านออกซิเดชัน. ใน นงลักษณ์ สุขวาณิชย์ศิลป์ (บรรณาธิการ). ความก้าวหน้าทางเภสัชวิทยา. กรุงเทพ ฯ : ไทยมิตรการพิมพ์.

สุมาลี เหลืองสกุล. 2530. คุณสมบัติของสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร.

A.J. Ruby, G. Kuttan, K. Dinesh Babu, K.N. Rajasekharan, R. kuttan (1995). Anti-tumour and antioxidation activity of natural curcuminiod. Cancer letter 94 (1995): 79-83

Aksaranugraha S. Freeradicals - production of exercise. Chula Med J. 2003; 47 : 139-148.

Arnaudo, J.F. 1991. The Taste of Nature. Industrial methods of natural plant product extraction biolandes. France: Labrit.

Berdy, J. ;Adorjan, A. ;Melvin, B. ;Karen, L. and Nitt, M.C. 1982. Handbook of antibiotic compound 9. Florida. CRC PRESS Inc. Eroca Rapon.

Brand-Williams, W. ;Cuvelier, M. and Bersert, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittle wissenschaft and Technologic. 28(1): 25-30.

Bravo, L., 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* 56(11): 317-333.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Croft, K.D. 1999. Antioxidant effect of plant effect of plant phenolic compound. In: Antioxidants in human health and disease, pp. 100-121. Basu, T.K.; temple, N.J. Garg, M.L., eds.UK: CABI Publishing.

Jorgensen, J.H. ;Tunidge, J.D. and Washington, J.A. 1999. Antimicrobial susceptibility test: dilution and disk diffusion methods. In: Muanual of clinical Microbiology, pp. 1526-1562. Murray, P.P. ;Barron, E.R. ; Praller, M.A. ;Tenover, F.C. and Yulken, R.H., eds. Washington, D.C.: ASMPress.

Lutfun Nahar, Wendy R. Rusell, Moira Middleton, Mohammaad Shoeb, Satyajit D. Sarker (2005). Antioxidant phenylacetic acid derivatives from the seeds of *Ilex aquifolium.* Acta Pharm. 55:187-193

Ohsugi, M. ;Fan, W. ;Hase, K. ;Xiong, Q. ;Tezuka, Y. ;Komatsu, T. ;Kenji, T.T. and Kadota, S. 1999. Active-Oxigen scavenging activity of traditional nourishingtonic herbal medicines and active constituents of *Rhodiola sacra.* Journal of Ethnppharmacology. 67:111-119.

Park, U.Y. ;Kim, Y.M.S.H. ;Chang, D.S. 1995. Investigation of optimum extracting condition and antimicrobial activity from the root bark of Morus alba. Journal of Food Hygiene Safety. 10:139-145.

Schugerl, K. 1994. Solvent extracting in biotechnology: recovery of primary and secondary metabolites. Berlin, Germany: Springer Verlag.

http://astrographics.com

http://www.chemistry.sc.chula.ac.th

http://www.childthai.org

http://www.gpo.or.th

http://www.panmai.com

http://rspg.thaigov.net

http://www.samunpri.com

http://techno.msu.ac.th

http://www.thaiclinic.com

http://www.thaigoodview.com

www.thailabonline.com

http://th.wikipedia.org

http://weddb.dmsc.moph.go.th

http://witec.ch/products/images/230040.gif

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร

Yeast extract-Malt extract Agar

- Yeast extract	4 กรัม
- Glucose	4 กรัม
- Malt extract	1 กรัม
- Distrilled water	1000 มิลลิลิตร

Nutient Agar (NA)

- Beef extract	3 กรัม
- Peptone	5 กรัม
- Agar	15 กรัม
- Diatrilled water	1000 มิลลิลิตร

Mueller Hinton Agar

เป็นอาหารสำเร็จรูป ปริมาตรที่ใช้คือ 38 กรัม ต่อ 1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- Beef infusion from	300 กรัม
- Casamino Acid Technical	17.5 กรัม
- Starch	1.5 กรัม
- Agar	17 กรัม

pH 7.3

Sabouraud's Dextrose Agar

เป็นอาหารสำเร็จรูป ปริมาตรที่ใช้คือ 65 กรัม ต่อ 1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- Enzymatic digest of casein	10 กรัม
- Dextrose	40 กรัม
- Agar	15 กรัม

pH 5.6

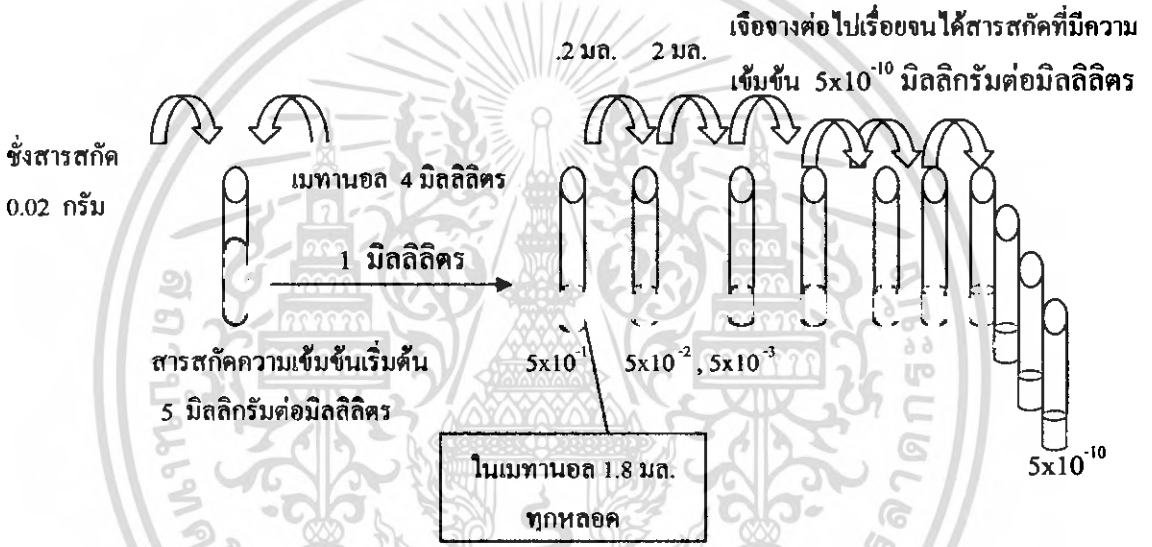
หมายเหตุ ไวต่อแสงเมื่อใช้เสร็จต้องปิดฝาให้สนิท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1 การเตรียมสารละลายต่างๆสำหรับวิเคราะห์หาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

1.1 การเตรียมสาสกัดหยาบของสมุนไพรและสารละลาย Quercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ชั่งสารสกัด 0.02 กรัม ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมเมทานอลปริมาตร 4 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดเริ่มต้นเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางต่อไปเรื่อยๆด้วยเมทานอลจนได้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น $5x10^{-1}$, $5x10^{-2}$, $5x10^{-3}$, $5x10^{-4}$, $5x10^{-5}$, $5x10^{-6}$, $5x10^{-7}$, $5x10^{-8}$, $5x10^{-9}$และ $5x10^{-10}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 2 มิลลิลิตร.



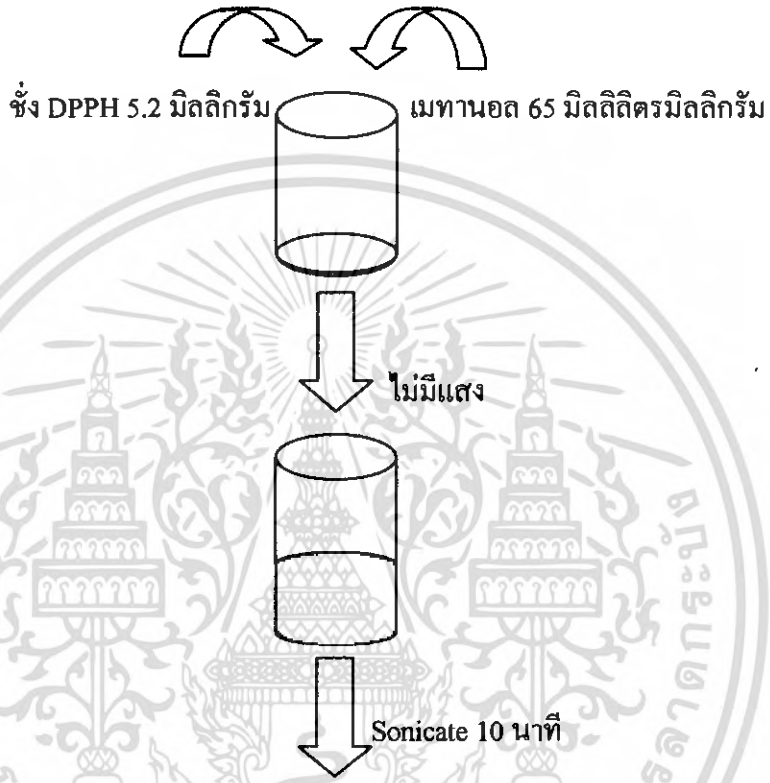
ภาพที่ 1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร

สำหรับการเรียมสารละลาย Quercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆทำโดยการชั่ง Quercetin 0.02 กรัม ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมเมทานอลปริมาตร 4 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดเริ่มต้นเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางต่อไปเรื่อยๆด้วยเมทานอลจนได้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น $5x10^{-1}$, $5x10^{-2}$, $5x10^{-3}$, $5x10^{-4}$, $5x10^{-5}$, $5x10^{-6}$, $5x10^{-7}$, $5x10^{-8}$ $5x10^{-9}$และ $5x10^{-10}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเตรียมสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 80 mg/ml (200μM)

ชั่ง DPPH 5.2 มิลลิกรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเมทานอล ปริมาตร 65 มิลลิลิตรจะได้ความเข้มข้นของสารละลาย DPPH เริ่มต้นเท่ากับ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 200 ไมโครโมลาร์



ภาพที่ 2 การเตรียมสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 80 mg/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้