

กิจกรรมการต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทย

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THAI MEDICINAL PLANT

ESSENTIAL OILS

นางสาวธิดารัตน์ วัฒนสุข

นายเมทธิ แสงพิทักษ์

นางสาววราภรณ์ สิงห์คำบาล

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2557

กิจกรรมการต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทย

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THAI MEDICINAL PLANT

ESSENTIAL OILS



นางสาวธิดารัตน์ วัฒนสุข

นายเมทนี แสงพิทักษ์

นางสาววราภรณ์ สิงห์คำบาล

สทว.

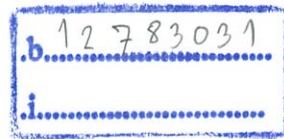
54827

2557

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน.....143123

วัน,เดือน,ปี...22 มี.ย. 2559



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2557

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THAI MEDICINAL PLANT
ESSENTIAL OILS

THIDARAT	WATTANASUK
METANEE	SANGPITAK
WARAPORN	SINGKUMBAL

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2014

หัวข้อโครงการพิเศษ กิจกรรมการต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทย
 Antifungal Activity of Thai Medicinal Plant Essential Oils

ชื่อนักศึกษา นางสาวธิดารัตน์ วัฒนสุข 54051211
 นายเมทธิ แสงพิทักษ์ 54051254
 นางสาววราภรณ์ สิงห์คำบาล 54051281

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต
 ภาควิชา ชีววิทยา
 ปีการศึกษา 2557
 อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้
 โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ประจำปี
 การศึกษา 2557

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร. คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ ประธานกรรมการ	คณิงกานต์ กลั่นบุศย์
ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการ	สุทธิจิต ศรีวัชรกุล
รศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	สุรีย์ นานาสมบัติ

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	กิจกรรมการต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย			
	Antifungal activity of Thai medicinal plant essential oils			
ชื่อนักศึกษา	นางสาวธิดารัตน์	วัฒนสุข	รหัสนักศึกษา	54051211
	นายเมทนี	แสงพิทักษ์	รหัสนักศึกษา	54051254
	นางสาววราภรณ์	สิงห์คำบาล	รหัสนักศึกษา	54051281
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)			
ภาควิชา	ชีววิทยา			
ปีการศึกษา	2557			
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ			

บทคัดย่อ

ในการศึกษากิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อรา 12 ชนิด โดยน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย 9 ชนิด ได้แก่ ว่านน้ำ (*Acorus calamus*) ข่า (*Alpinia galanga*) โกฎเชียง (*Angelica sinensis*) โกฎจุฬาลัมพา (*Artemisia annua*) อบเชย (*Cinnamomum verum*) ว่านนางคำ (*Curcuma aromatica*) ว่านเต่าเกียด (*Homalomena aromatica*) เปราะหอม (*Kaempferia galanga*) และกานพลู (*Syzygium aromaticum*) น้ำมันอบเชยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทุกชนิดที่ทดสอบได้ดีที่สุดโดยเฉพาะเชื้อรา *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Fusarium moniliforme*, *Geotrichum candidum* และ *Penicillium citrinum* ไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันอบเชยมากที่สุด (ค่า Minimum Inhibitory Concentration หรือ MIC เท่ากับ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Rhizopus stolonifer* และ *Trichoderma harzianum* ถูกยับยั้งได้โดยน้ำมันอบเชยที่ค่า MIC เท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทุกชนิดที่ทดสอบที่ค่า MIC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อรา *A. versicolor* ไวต่อการถูกยับยั้งการเจริญโดยน้ำมันว่านเต่าเกียดมากที่สุด (มีค่า MIC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ขณะที่เชื้อรา *A. parasiticus*, *F. moniliforme*, *P. citrinum* และ *T. harzianum* ไวต่อการถูกยับยั้งการเจริญโดยน้ำมันเปราะหอมมากที่สุด (มีค่า MIC เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นอกจากนี้เชื้อรา *A. flavus*, *F. moniliforme* และ *T. harzianum* ไวต่อการถูกยับยั้งการเจริญโดยน้ำมันว่านน้ำมากที่สุด (มีค่า MIC เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นอกจากนี้ น้ำมันคู่ผสม 3 คู่ i) น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันกานพลู ii) น้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และ iii) น้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียด ให้ปฏิสัมพันธ์ที่เสริมฤทธิ์กันบางส่วนต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A.*

terreus, *P. citrinum* และ *T. harzianum* (Fractional Inhibitory Concentration Index หรือ FICI มีค่าเท่ากับ 0.56-0.66)

สำหรับกิจกรรมการต้านการเจริญของยีสต์ 8 ชนิด โดยน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย ทั้ง 9 ชนิด พบว่าน้ำมันว่านน้ำมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ทุกชนิดที่ทดสอบได้ดีที่สุดโดยเฉพาะ *Candida lipolytica* และ *Hanseniaspora uvarum* ไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันว่านน้ำมากที่สุดโดย (ค่า MIC เท่ากับ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนยีสต์ *Candida albicans*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe* และ *Zygosaccharomyces rouxii* ถูกยับยั้งได้โดยน้ำมันว่านน้ำที่ค่า MIC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำมันอบเชยและน้ำมันว่านเต่าเกียดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ทุกชนิดที่ทดสอบ (ค่า MIC เท่ากับ 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ยีสต์ *C. lipolytica* ไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันกานพลูมากที่สุด ส่วนยีสต์ *D. hansenii* ไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันเปราะหอมมากที่สุด (ค่า MIC เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) น้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลูให้ปฏิสัมพันธ์ที่เสริมฤทธิ์กันบางส่วนในการยับยั้งการเจริญของ *H. uvarum* (FICI เท่ากับ 0.75) แต่ น้ำมันผสมคู่นี้แสดงปฏิสัมพันธ์ที่ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans*, *P. membranaefaciens* และ *R. glutinis* (FICI มีค่าเท่ากับ 1.0) คู่ผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียดแสดงปฏิสัมพันธ์ที่เสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของ *P. membranaefaciens* (FICI มีค่าเท่ากับ 0.31) แต่ น้ำมันผสมคู่นี้แสดงปฏิสัมพันธ์ที่เสริมฤทธิ์กันบางส่วนในการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans*, *H. uvarum* และ *R. glutinis* (FICI มีค่าเท่ากับ 0.56-0.75) นอกจากนี้คู่ผสมของน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียดแสดงปฏิสัมพันธ์ที่เสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของ *R. glutinis* (FICI มีค่าเท่ากับ 0.31) แต่ น้ำมันผสมคู่นี้แสดงปฏิสัมพันธ์ที่เสริมฤทธิ์กันบางส่วนในการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans*, *H. uvarum* และ *P. membranaefaciens* (FICI มีค่าเท่ากับ 0.56-0.75)

ในการศึกษาสมบัติทางพิษเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยทั้ง 9 ชนิด น้ำมันกานพลูมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดในบรรดาน้ำมันหอมระเหยทั้งหมดที่ทดสอบโดยค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของน้ำมันโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging มีค่า ferric reducing capacity เท่ากับ 3.69 มิลลิโมล Fe (II) ต่อกรัม โดยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) และสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ได้ค่าความเข้มข้นเท่ากับ 998.62 มิลลิกรัมโทริลออกซ์ต่อกรัม โดยวิธี ABTS radical cation decolorization นอกจากนี้ น้ำมันกานพลูยังมีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในปริมาณที่สูงมีค่าเท่ากับ 889.17 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำมัน และ 141.91 มิลลิกรัมคาเทชินต่อกรัมของน้ำมัน ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยชนิดที่อื่นมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์สูงรองลงมาคือ น้ำมันข่า น้ำมันว่านนางคำ น้ำมันโกฐจุฬาลัมพา น้ำมันเปราะหอม น้ำมันว่านเต่าเกียด น้ำมันว่านน้ำ และน้ำมันอบเชย

คำสำคัญ : สมุนไพรไทย วิธีการแปรบนอากาศร้อน กิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

Title	Antifungal activity of Thai medicinal plant essential oils		
Students	Miss Thidarat	Wattanasuk	Student ID 54051211
	Mr. Metanee	Sangpitak	Student ID 54051254
	Miss Waraporn	Singkumbal	Student ID 54051281
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)		
Department	Biology		
Academic Year	2014		
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Suree Nanasombat		

Abstract

Antifungal activity of essential oils extracted from 12 Thai medicinal plants including calamus (*Acorus calamus*), greater galangal (*Alpinia galanga*), dong quai (*Angelica sinensis*), sweet wormwood (*Artemisia annua*), cinnamon (*Cinnamomum verum*), wild turmeric (*Curcuma aromatica*), sugandh mantri (*Homalomena aromatica*), cekor (*Kaempferia galanga*) and clove (*Syzygium aromaticum*) was studied. Cinnamon oil exhibited broad antifungal action. The most susceptible mold strains to the cinnamon oil were *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Fusarium moniliforme*, *Geotrichum candidum* and *Penicillium citrinum* (minimum inhibitory concentration, MIC of 0.125 mg/ml). However, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Rhizopus stolonifer* and *Trichoderma harzianum* were inhibited by cinnamon oil at higher MIC (0.25 mg/ml). Clove oil was effective to inhibit of all mold species tested with the MIC of 0.5 mg/ml. *A. versicolor* was the most sensitive mold strain to sugandh mantri oil (0.5 mg/ml MIC), while *A. parasiticus*, *F. moniliforme*, *P. citrinum* and *T. harzianum* were the most vulnerable mold species to cekor oil (2 mg/ml MIC). In addition, *A. flavus*, *F. moniliforme* and *T. harzianum* were sensitive to calamus oil (2 mg/ml MIC). In addition, three oil combinations: i) cinnamon and clove oils ii) cinnamon and sugandh mantri oils, and iii) clove and sugandh mantri oils showed partial synergism to inhibit the growth of *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. terreus*, *P. citrinum* and *T. harzianum* (0.56-0.66 Fractional Inhibitory Concentration index, FICI).

The antifungal activity of plant essential oils against eight yeast species was evaluated. Calamus oil had the highest antifungal activity against all yeast strains tested. *Candida lipolytica* and *Hanseniaspora uvarum* (0.125 mg/ml MIC), while *Candida albicans*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Zygosaccharomyces rouxii* were sensitive to calamus oil with the MIC of 0.5 mg/ml. Cinnamon and sugandh mantri oils were effective to inhibit the growth of all yeast strains tested with the MIC of 0.5 and 1.0 mg/ml, respectively. *C. lipolytica* were the most sensitive to clove oil (0.25 mg/ml MIC), whereas *D. hansenii* was the most sensitive to cekor oil (1.0 mg/ml MIC). Cinnamon and clove oil combination exhibited partial synergism to inhibit the growth of *H. uvarum* (0.75 FICI), but this oil combination exhibited no effect to inhibit the growth of *C. albicans*, *P. membranaefaciens* and *R. glutinis* (1.0 FIC). The combination of cinnamon and sugandh mantri oils showed synergism to inhibit the growth of *P. membranaefaciens* (0.31 FICI), but this oil combination exhibited partial synergism to inhibit the growth of *C. albicans*, *H. uvarum* and *R. glutinis* (0.56–0.75 FICI). In addition, combination of clove and sugandh mantri oils had synergism to inhibit the growth of *R. glutinis* (0.31 FICI), but this oil combination showed partial synergism to inhibit the growth of *C. albicans*, *H. uvarum* and *P. membranaefaciens* (0.56–0.75 FICI).

The phytochemical properties of nine plant essential oils were studied. Among all oils tested, clove oil had the best antioxidant activity with IC_{50} of 0.58 mg/ml using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, 3.69 mmol Fe(II)/g ferric reducing capacity using ferric reducing antioxidant power (FRAP) method and 998.62 mg trolox/g oil inhibiting $ABTS^{++}$ free radical formation using ABTS radical cation decolorization assay. In addition, clove oil had total phenolics and flavonoids of 889.17 mg gallic acid equivalent/g oil and 141.91 mg catechin equivalent/g oil, respectively. Other oils with relatively strong antioxidant activity, total phenolics and flavonoids were oils of greater galangal, wild turmeric, sweet wormwood, cekor, sugandh mantri, calamus and cinnamon oils.

Keyword: Thai medicinal plants, disc diffusion method, antifungal activities

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้จะไม่สำเร็จลุล่วงไปได้ หากไม่ได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษารองศาสตราจารย์ ดร.สุรีย นานาสมบัติ ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ ให้คำแนะนำปรึกษา และทักษะกระบวนการในการปฏิบัติงานที่ดี และเป็นประโยชน์ให้แก่ผู้จัดทำอย่างสม่ำเสมอตลอดมา ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ ประธานกรรมการสอบโครงการพิเศษ และ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการสอบโครงการพิเศษ ที่ได้ให้คำแนะนำ ชี้แนะในการแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการพิเศษนี้ ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ สาขาวิชาชีววิทยา และเจ้าหน้าที่ของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่านที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง อีกทั้งยังอำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่เพื่อปฏิบัติงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาของผู้จัดทำที่เป็นกำลังใจ และให้คำปรึกษาในการทำโครงการพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณพี่ๆ และเพื่อนๆ ที่คอยให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา อีกทั้งยังแลกเปลี่ยนความคิดเห็น และมิตรภาพที่ดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่สาธารณชนและผู้ที่มีสนใจในการศึกษาหาความรู้ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยด้านนี้

นางสาวธิดารัตน์

วัฒนสุข

นายเมทนี

แสงพิทักษ์

นางสาววราภรณ์

สิงห์คำบาล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญรูป	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 พืชสมุนไพร	4
2.2 ความสำคัญของพืชสมุนไพร	4
2.3 สมุนไพรไทยที่ใช้ในการวิจัย	5
2.3.1 ว่านน้ำ	5
2.3.2 ช่า	6
2.3.3 โกงฐเชียง	7
2.3.4 โกงฐจุฬาลัมพา	8
2.3.5 อบเชย	9
2.3.6 ว่านนางคำ	10
2.3.7 ว่านเต่าเกียด	11
2.3.8 เปราะหอม	12
2.3.9 กานพลู	13
2.4 น้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร	14
2.5 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย	15
2.6 โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย	16
2.7 น้ำมันหอมระเหยแบ่งตามองค์ประกอบทางเคมี	18
2.7.1 Monoterpenes essential oil	18
2.7.1.1 Monoterpene hydrocarbon essential oils	18
2.7.1.2 Aldehyde essential oils	19
2.7.1.3 Ketone essential oils	20

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.7.1.4 Phenolic essential oils	20
2.7.1.5 Oxide/Peroxide essential oils	21
2.7.1.6 Alcohol essential oils	21
2.7.1.7 Ester essential oils	23
2.7.2 Sesquiterpenes essential oils	23
2.7.3 Phenylpropanes essential oils	23
2.8 ฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหย	24
2.8.1 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์	24
2.8.1.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย	24
2.8.1.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อราและยีสต์	24
2.8.1.3 ฤทธิ์ต้านไวรัส	25
2.9 กลไกการทำงานการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย	25
2.9.1 กลไกการยับยั้งแบคทีเรีย	25
2.9.2 กลไกการยับยั้งเชื้อราและยีสต์	26
2.10 ความหมายของอนุมูลอิสระ	27
2.11 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน	27
2.11.1 Initiation	27
2.11.2 Propagation	28
2.11.3 Termination	28
2.12 สารต้านออกซิเดชัน	28
2.13 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ	28
2.13.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์	29
2.13.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ	29
2.14 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ	30
2.14.1 ดักจับอนุมูลอิสระ	30
2.14.2 ยับยั้งการทำงานของซิงเกิ้ลทออกซิเจน	30
2.14.3 จับกับโลหะที่สามารถเร่งสารกลุ่มนี้	30
2.14.4 หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ	31
2.14.5 เสริมฤทธิ์	31
2.14.6 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ	31
2.15 สารต้านอนุมูลอิสระกับการป้องกันโรค	31

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.16 ตัวอย่างสารต้านออกซิเดชันบางชนิด	32
2.16.1 วิตามินซี	32
2.16.2 วิตามินอี	32
2.16.3 สารประกอบฟีนอลิก	32
2.16.4 บีเอชเอ (BHA)	33
2.16.5 บีเอชที (BHT)	33
2.16.6 สารคีเลทโลหะ (metal chelator)	33
2.17 การสกัดและการตรวจสอบฤทธิ์ของสารในอนุมูลอิสระ	34
2.17.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช	34
2.17.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ	35
2.17.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส	35
2.18 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	36
2.18.1 เชื้อรา	36
2.18.1.1 <i>Alternaria alternata</i>	36
2.18.1.2 <i>Aspergillus flavus</i>	36
2.18.1.3 <i>Aspergillus niger</i>	37
2.18.1.4 <i>Aspergillus ochraceus</i>	37
2.18.1.5 <i>Aspergillus parasiticus</i>	38
2.18.1.6 <i>Aspergillus terreus</i>	38
2.18.1.7 <i>Aspergillus versicolor</i>	39
2.18.1.8 <i>Fusarium moniliforme</i>	39
2.18.1.9 <i>Geotrichum candidum</i>	40
2.18.1.10 <i>Penicillium citrinum</i>	40
2.18.1.11 <i>Rhizopus stolonifer</i>	41
2.18.1.12 <i>Trichoderma harzianum</i>	41
2.18.2 ยีสต์	42
2.18.2.1 <i>Candida albicans</i>	42
2.18.2.2 <i>Candida lipolytica</i>	43
2.18.2.3 <i>Debaryomyces hansenii</i>	43

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.18.2.4 <i>Hanseniaspora uvarum</i>	44
2.18.2.5 <i>Pichia membranaefaciens</i>	44
2.18.2.6 <i>Rhodotorula glutinis</i>	45
2.18.2.7 <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	45
2.18.2.8 <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	46
2.19 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	46
2.19.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหย	47
2.19.2 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย	48
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	49
3.1 อุปกรณ์	49
3.1.1 วัสดุที่ใช้ในการทดลอง	49
3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	51
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง	51
3.1.4 สารเคมีและชุดทดสอบที่ใช้ในการทดลอง	51
3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	52
3.2 วิธีการทดลอง	52
3.2.1 การเตรียมน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย	52
3.2.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์	52
3.2.2.1 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา	52
3.2.2.2 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเซลล์ยีสต์	53
3.2.3 การศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย	53
3.2.3.1 การศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์โดยวิธี Agar disc diffusion	53
3.2.3.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ (MIC) โดยวิธี Agar dilution	54
3.2.3.3 การศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์	54
3.2.4 สมบัติทางพิษเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย	55
3.2.4.1 การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทย	55

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.4.1.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay)	55
3.2.4.1.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay)	56
3.2.4.1.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยด้วยวิธี ABTS radical cation decolorization assay	57
3.2.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร	57
3.2.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร	58
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	59
4.1 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพืชสมุนไพร	59
4.2 สมบัติการต้านเชื้อราและยีสต์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย	60
4.2.1 ผลการศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรด้วยวิธีการแพร่บนอาหารวุ้น (Agar disc diffusion) และวิธีการเจือจางในอาหารแข็ง (Agar dilution)	60
4.2.2 การศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์	69
4.3 สมบัติทางพิษเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย	73
4.3.1 การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	73
4.3.1.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay)	73
4.3.1.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay)	73
4.3.1.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay)	74
4.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของน้ำมันหอมระเหย	74

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของน้ำมันหอมระเหย	75
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	81
5.1 สรุปผลการวิจัย	81
5.2 ข้อเสนอแนะ	82
เอกสารอ้างอิง	84
ภาคผนวก	99
ภาคผนวก ก	100
ภาคผนวก ข	103
ภาคผนวก ค	106
ภาคผนวก ง	114
ภาคผนวก จ	119
ภาคผนวก ฉ	127

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.15 สารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	31
2.15 สารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ต่อ)	32
3.1 สมุนไพรที่นำมาใช้ในการกลั่นน้ำมันหอมระเหย	49
3.1 สมุนไพรที่นำมาใช้ในการกลั่นน้ำมันหอมระเหย (ต่อ)	50
4.1 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพืชสมุนไพรแต่ละชนิด	59
4.2.1.1 สมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย ด้วยวิธีการแพร่บนวุ้นอาหาร (Agar disc diffusion method)	65
4.2.1.2 สมบัติการยับยั้งการเจริญของยีสต์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยด้วยวิธีการแพร่บนวุ้นอาหาร (Agar disc diffusion method)	66
4.2.1.3 สมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยที่ความเข้มข้นต่ำสุดด้วยวิธีการเจือจางในอาหารแข็ง (Agar dilution)	67
4.2.1.4 สมบัติการยับยั้งการเจริญของยีสต์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยที่ความเข้มข้นต่ำสุดด้วยวิธีการเจือจางในอาหารแข็ง (Agar dilution)	68
4.2.2.1 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยเมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC _c) ค่า fractional inhibitory concentration (FIC) และค่า FIC index (FICI) ของน้ำมันผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลู น้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา	71
4.2.2.2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยเมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC _c) ค่า fractional inhibitory concentration (FIC) และค่า FIC index (FICI) ของน้ำมันผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลู น้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียดในการยับยั้งการเจริญของยีสต์	72
4.3 สมบัติทางพิษวิทยาของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย	80
ก.1 การเตรียมน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ในการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC)	102
ข.1 Stock ของยา Amphotericin B ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของเชื้อรา	105
ข.2 Stock ของยา Amphotericin B ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของยีสต์	105
ค.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลาย FeSO ₄ · 7H ₂ O	109
ค.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก	112
ค.3 การทำการเจือจางของสารละลายมาตรฐานคาเทชินที่ความเข้มข้นต่างๆ	113

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ง.1 สมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยด้วยวิธีการแพร่บนวุ้นอาหาร (Agar disc diffusion method)	115
ง.2 สมบัติการยับยั้งการเจริญของยีสต์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยด้วยวิธีการแพร่บนวุ้นอาหาร (Agar disc diffusion method)	116
ง.3 สมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของยา Amphotericin B (mg/ml) ด้วยวิธีการแพร่บนวุ้นอาหาร (Agar disc diffusion method)	117
ง.4 สมบัติการยับยั้งการเจริญของยีสต์ของยา Amphotericin B (mg/ml) ด้วยวิธีการแพร่บนวุ้นอาหาร (Agar disc diffusion method)	118
จ.1 รูปแบบของการผสมของน้ำมันหอมระเหย	120
จ.2 ความเข้มข้นของ stock solution กับความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันอบเชยน้ำมันกานพลู	122
จ.2 ความเข้มข้นของ stock solution กับความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันอบเชยน้ำมันกานพลู (ต่อ)	123
จ.3 การยับยั้งการเจริญของ <i>C. albicans</i> โดยน้ำมันผสมระหว่างอบเชยกับกานพลู	123
จ.3 การยับยั้งการเจริญของ <i>C. albicans</i> โดยน้ำมันผสมระหว่างอบเชยกับกานพลู (ต่อ)	124
จ.4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยเมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_c) ค่า fractional inhibitory concentration (FIC) และค่า FIC index (FICI) ของน้ำมันผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลู น้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา	125
จ.5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยเมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_c) ค่า fractional inhibitory concentration (FIC) และค่า FIC index (FICI) ของน้ำมันผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลู น้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียดในการยับยั้งการเจริญของยีสต์	126
ฉ.1 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical	128

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.3.1 ว่านน้ำ	5
2.3.2 ช่า	6
2.3.3 โกฐเชียง	7
2.3.4 โกฐจุฬาลัมพา	8
2.3.5 อบเชย	9
2.3.6 ว่านนางคำ	10
2.3.7 ว่านเต่าเกียด	11
2.3.8 เปราะหอม	12
2.3.9 กานพลู	13
2.6.1 Isoprene unit	16
2.6.2 Monoterpenes ชนิดเรียงตัวแบบเป็นวง	17
2.6.3 Monoterpenes ชนิดเรียงตัวแบบไม่เป็นวง	17
2.6.4 Sesquiterpenes	17
2.6.5 Phenylpropanes	18
2.7.1.1 Monoterpenes: 2 isoprene รวมกันเป็น monoterpene	19
2.7.1.2 Aldehydes	19
2.7.1.3 Ketone	20
2.7.1.4 Phenols(a) Chavicol; (b) p-cresol; (c) carvaccrol	21
2.7.1.5 Oxides	21
2.7.1.6.1 Alcohols-monoterpenols (10 C)	22
2.7.1.6.2 Alcohols-sesquiterpenols (15 C)	22
2.7.1.6.3 Alcohols-diols (20 C)	23
2.13.1 โครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์	29
2.18.1.1 <i>Alternaria alternate</i>	36
2.18.1.2 <i>Aspergillus flavus</i>	36
2.18.1.3 <i>Aspergillus niger</i>	37
2.18.1.4 <i>Aspergillus ochraceus</i>	37
2.18.1.5 <i>Aspergillus parasiticus</i>	38
2.18.1.6 <i>Aspergillus terreus</i>	38
2.18.1.7 <i>Aspergillus versicolor</i>	39
2.18.1.8 <i>Fusarium moniliforme</i>	39
2.18.1.9 <i>Geotrichum candidum</i>	40
2.18.1.10 <i>Penicillium citrinum</i>	40

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
2.18.1.11 <i>Rhizopus stolonifera</i>	41
2.18.1.12 <i>Trichoderma harzianum</i>	41
2.18.2.1 <i>Candida albicans</i>	42
2.18.2.2 <i>Candida lipolytica</i>	43
2.18.2.3 <i>Debaryomyces hansenii</i>	43
2.18.2.4 <i>Hanseniaspora uvarum</i>	44
2.18.2.5 <i>Pichia membranaefaciens</i>	44
2.18.2.6 <i>Rhodotorula glutinis</i>	45
2.18.2.7 <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	45
2.18.2.8 <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	46
ฉ.1 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง DPPH radical ของน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้นต่างๆ	129
ฉ.2 กราฟมาตรฐานสารละลายเฟอรรัสซัลเฟตสำหรับการวิเคราะห์หากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี (FRAP) assay แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร กับปริมาณเนื้อสารของเฟอรรัสซัลเฟตหน่วยมิลลิโมล (ซ้ำที่ 1)	132
ฉ.3 กราฟมาตรฐานสารละลายโทรล็อกซ์สำหรับการวิเคราะห์หาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร กับปริมาณเนื้อสารของโทรล็อกซ์ในหน่วยไมโครกรัม (ซ้ำที่ 1)	135
ฉ.4 กราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิกสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร กับปริมาณเนื้อสารของกรดแกลลิกในหน่วยไมโครกรัม (ซ้ำที่ 1)	137
ฉ.5 กราฟมาตรฐานสารละลายคาเทชินสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร กับปริมาณเนื้อสารของคาเทชินในหน่วยไมโครกรัม (ซ้ำที่ 1)	140

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

น้ำมันหอมระเหยเป็นสารประกอบที่ซับซ้อนได้จากธรรมชาติซึ่งระเหยได้พบใน aromatic plant เป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของพืชซึ่งได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) หรือ กลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) น้ำมันหอมระเหยถูกสังเคราะห์มาจากส่วนต่างๆ ของพืชได้แก่ ดอกตูม ดอก ใบ ลำต้น กิ่งไม้ เมล็ด ผล ราก ไม้หรือเปลือกไม้ ในธรรมชาติน้ำมันหอมระเหยมี กิจกรรมต้านแบคทีเรีย กิจกรรมต้านเชื้อรา และฆ่าแมลงได้ซึ่งเป็นผลมาจากการที่น้ำมันหอมระเหยมี สารประกอบที่หลากหลายซับซ้อนซึ่งมีประมาณ 20-60 สารประกอบ แต่ส่วนใหญ่มีสารประกอบหลัก ที่มีปริมาณมากอยู่เพียง 2-3 ชนิด ซึ่งพบที่ความเข้มข้นสูง (ร้อยละ 20-70) และมีสารประกอบชนิด อื่นอีกหลายชนิดในปริมาณเพียงเล็กน้อย (Bakkali และคณะ, 2008)

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลายโดยสามารถก่อโรคกับ พืชหลายชนิดและเป็นต้นเหตุที่ทำให้อาหารหลายชนิดเน่าเสียซึ่งอาหารที่เน่าเสียโดยเชื้อราจะมี ลักษณะปรากฏเปลี่ยนแปลงไปทั้งสี กลิ่นรส และลักษณะเนื้อสัมผัสนอกจากนี้เชื้อราบางชนิดยัง สามารถสร้างสารก่อภูมิแพ้ในอาหารได้ด้วย (Filtenborg และคณะ, 1996; Montville และ Matthews, 2005) สำหรับเชื้อรามีรายงานว่าทำให้ผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิดได้รับความ เสียหาย เช่น เชื้อราในสกุล *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* และ *Rhizopus* ซึ่งพบในข้าวโพด ซึ่งเชื้อราเหล่านี้สามารถสร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพได้ (Shah และคณะ, 2010; Nakai และคณะ, 2008) นอกจากนี้เชื้อราในสกุล *Alternaria* พบว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลไม้ตระกูล ส้ม แอปเปิ้ล หัวหอม กะหล่ำปลี และแครอทเกิดการเน่าเสีย (Montville และ Matthews, 2005; Jay และคณะ, 2005; Znini และคณะ, 2013) และยังพบว่าเชื้อรา *Geotrichum candidum* เป็น สาเหตุที่ทำให้มะเขือเทศ และผลไม้ที่มีรสเปรี้ยวเน่าเสียได้อีกด้วย (Jay และคณะ, 2005) ส่วน *Rhizopus stolonifer* เป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของมันเทศ มะเขือเทศ และแอปเปิ้ล (Jay และคณะ, 2005; Znini และคณะ, 2013) เชื้อราในสกุล *Fusarium* เป็นสาเหตุการเสียหายของ หน่อไม้ฝรั่ง และมันฝรั่ง (Montville และ Matthews, 2005) ส่วนยีสต์ถึงแม้จะเป็นปัญหาไม่มากนัก แต่ยีสต์หลายสกุลสามารถทำให้อาหารเน่าเสียได้เช่น ยีสต์ที่เป็นสาเหตุการเสียหายของผลไม้แห้งได้แก่ *Zygosaccharomyces rouxii*, *Hanseniaspora*, *Candida* และ *Pichia* sp. (Montville และ Matthews, 2005) โดยเฉพาะ *Z. Rouxii* และ *Schizosaccharomyces* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการ เน่าเสียของน้ำผึ้ง น้ำผลไม้ เครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบที่ความเข้มข้นสูง (Kurtzman และ James, 2006) ดังนั้นจึงควรหาวิธีป้องกันการเน่าเสียของพืชชนิดต่างๆ เหล่านี้ สำหรับการใช้น้ำมันหอมระเหยในการควบคุมการเจริญของเชื้อราเป็นทางเลือกหนึ่งที่นิยมเนื่องจาก เป็นสารธรรมชาติจึงมีความปลอดภัยสูงกว่าการใช้สารเคมีในการต้านเชื้อราและเป็นที่ยอมรับของ

ผู้บริโภค มีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชหลายชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิดที่ทำให้ผลิตผลทางการเกษตรเน่าเสีย (Xing และคณะ, 2012; Soliman และ Badaea, 2002)

อีกทั้งน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรยังมีรายงานว่ามียกกรรมทางด้านอนุมูลอิสระได้ดีอีกด้วย (Singh และ Lawrence, 2015; Al-Reza และคณะ, 2010) นอกจากนี้การใช้น้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิดได้ดี มีรายงานว่าการผสมกันของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลูมีให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิดได้ดี (Sukatta และคณะ, 2008; Matan และคณะ, 2006) ส่วนน้ำมันว่านเต่าเกียดมีรายงานว่าต้านเชื้อราและยีสต์ได้ดี (Singh และคณะ, 2000; Policegoudra และคณะ, 2012) แต่ยังมีรายงานการศึกษากิจกรรมต้านเชื้อราในรูปแบบน้ำมันผสมที่น้อย

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะมีการศึกษากิจกรรมต้านเชื้อราของน้ำมันที่ได้จากเครื่องเทศและพืชสมุนไพรหลายชนิดแล้วแต่กิจกรรมต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยบางชนิดยังมีการศึกษาน้อย เช่น น้ำมันว่านน้ำ น้ำมันโกฐเชียง น้ำมันโกฐจุฬาลัมพา น้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันเปราะหอม ยังมีรายงานวิจัยที่ค่อนข้างน้อย จึงควรมีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยว่านน้ำเป็นพืชสมุนไพรซึ่งส่วนของเหง้า ราก และน้ำมันหอมระเหยของว่านน้ำมักเป็นส่วนที่นำมาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่เคยมีรายงานว่ามียกกรรมต้านเชื้อราได้ (Lee และคณะ, 2004) และมีรายงานว่า α - และ β -asarones เป็นสารสำคัญของน้ำมันว่านน้ำ (Raina และคณะ, 2003) โกฐเชียงเป็นพืชสมุนไพรซึ่งส่วนที่มักนำมาใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจะเป็นส่วนของรากและมีปริมาณของน้ำมันหอมระเหยที่ค่อนข้างน้อย ส่วนโกฐจุฬาลัมพาเป็นพืชสมุนไพรที่สามารถเจริญได้ตามธรรมชาติโดยมีรายงานว่าน้ำมันโกฐจุฬาลัมพามีสารสำคัญคือ camphor และมีกิจกรรมต้านเชื้อราและยีสต์ได้ (Bilia และคณะ, 2014) ว่านเต่าเกียดเป็นพืชสมุนไพรที่เป็นไม้ยืนต้นพบในเขตร้อนโดยส่วนของพืชที่มักนำมาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจะเป็นส่วนของเหง้าและพบว่าส่วนนี้เป็นแหล่งของน้ำมันหอมระเหยซึ่งมีสารสำคัญคือ linalool และมีกิจกรรมต้านเชื้อราและยีสต์ได้ดี (Policegoudra และคณะ, 2012) สำหรับเปราะหอมเป็นพืชสมุนไพรที่พบในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น หัวของเปราะหอมช่วยในการขับเสมหะ ขับปัสสาวะ ขับลม ลดอาการไอ และหอบหืด ส่วนใบเป็นโลชั่นทาผิวได้ ใช้พอกแก้เจ็บตา เจ็บคอ แก้ววม แก้วโรไขข้อและบรรเทาอาการไข้ได้ และน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากเหง้าเปราะหอมพบว่ามีสารสำคัญคือ ethyl p-methoxycinnamate (Bhuiyan และคณะ, 2008) และยังมีกิจกรรมต้านเชื้อราได้ด้วย (Ghani, 2003)

สภาวะเครียดจากกระบวนการออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในร่างกายมนุษย์ มีผลทำให้เกิดกระบวนการแก่ชรา (aging) และโรคเรื้อรังต่างๆ (chronic disease) เนื่องจากในสภาวะที่มีออกซิเจนมนุษย์ได้เผชิญกับสิ่งแวดล้อมที่เต็มไปด้วยปัจจัยหลายๆ อย่าง เช่น ความเครียด มลภาวะ รังสียูวี ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ภายในร่างกาย ซึ่งผลของ ROS ในทางที่เป็นอันตรายคือ ROS เริ่มต้นวงจรการเกิดออกซิเดชันของไขมันซึ่งบ่อยครั้งที่การเกิดโรคส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการเกิดออกซิเดชันของไขมันในเซลล์เช่น เยื่อหุ้มที่มีไขมัน ดีเอ็นเอ และโปรตีน (Wei และ Shibamoto, 2010) ดังนั้นการรับประทานพืชสมุนไพรรวมทั้งน้ำมันหอมระเหยซึ่งอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นวิธีหนึ่งในการแก้ปัญหา สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ สารใดๆ ที่เมื่อมีอยู่ในระดับความเข้มข้นต่ำจะช่วยชะลอหรือยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของสารซับซ้อน สารต้านอนุมูลอิสระสามารถเข้ากระทำในหลายๆ ขั้นตอนของปฏิกิริยาที่เป็นผลจากการออกซิเดชัน (oxidative sequence) เช่น การขจัดออกซิเจนหรือลดปริมาณความ

เข้มข้นของออกซิเจนที่ลดลงบริเวณนั้นๆ การขจัดไอออนของโลหะที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา การขจัด ROS/RNS (reactive nitrogen species) ชนิดหลักเช่น O_2^- , H_2O_2 , HOCl, O_2 , หรือ ONOO⁻ การไปจับอนุมูลอิสระที่เป็นตัวเริ่มต้นปฏิกิริยาเช่นอนุมูล OH^{\cdot} , RO^{\cdot} , RO_2^{\cdot} และการไปขัดขวางปฏิกิริยาลูกโซ่ที่เกิดขึ้น (Gutteridge และ Halliwell, 1999) ผลในเชิงรักษา (therapeutic effect) ของน้ำมันหอมระเหยที่มีการรายงานไว้อาจเกี่ยวข้องกับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหย (Wei และ Shibamoto, 2010) ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะศึกษา กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรเช่น น้ำมันว่านน้ำ น้ำมันโกฐเชียง น้ำมันโกฐจุฬาลัมพา น้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันเปราะหอม เนื่องจากมีรายงานการศึกษากิจกรรมต้านการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันเหล่านี้ค่อนข้างน้อย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์โดยน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทย
- 2) เพื่อศึกษาสมบัติทางพิษเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย
- 3) เพื่อศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ในโครงการพิเศษนี้ทำการศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและกิจกรรมทางพิษเคมีอื่นๆ ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยหลายชนิด เพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยที่มีกิจกรรมดังกล่าวที่สูงมาประยุกต์กับผลิตภัณฑ์ผักผลไม้และอาหารสดรวมถึงผลิตภัณฑ์อุปโภคบริโภคต่างๆ ในเชิงอุตสาหกรรมได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบถึงชนิดน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยที่มีสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ที่เป็นสาเหตุทำให้อาหาร พืชผัก ผักผลไม้เน่าเสีย และสมบัติทางด้านพิษเคมี เช่น สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบพลาโวนอยด์ทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหยของพืชสมุนไพรไทย

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พืชสมุนไพร

สมุนไพรของประเทศไทยมีคุณสมบัติในการที่จะนำมาผลิตเป็นยารักษาโรคได้กว่า 300 ชนิด เช่น รากชะง่อน (*Rauvolfia* sp.) สามารถสกัดสารมาผลิตเป็นยารักษาโรคความดันโลหิตสูง หัวดองดิงส์ (*Gloriosa superba* Linn.) มีสารที่สามารถบำบัดอาการโรครูมาติซึม ไบทองพันชั่งสดๆ หรือตากแห้งต้มน้ำหรือชงกับน้ำร้อนดื่มวันละ 2-3 ครั้งๆ ละครั้งถ้วยแก้วรักษาอาการตกขาวในสุภาพสตรี อาการผม่ว่งไข้ไบเพสลาดของทองพันชั่งสดๆ มาต้มน้ำกับน้ำบริสุทธิ์แล้วนำกากของทองพันชั่งพอกบนศีรษะบริเวณผม่ว่งไข้ผ้าขาวโปกคาดไว้ระวังอย่าให้กากไบทองพันชั่งแห้งถ้าแห้งให้ใช้น้ำเย็นสะอาดหยดใส่กากไบให้ชุ่มเสมอ ปฏิบัติติดต่อกัน 15-30 วัน สามารถทำให้ผมงอกขึ้นมาใหม่ได้หรือการแพทย์แผนโบราณของไทยใช้น้ำมะพร้าวชโลมรักษาแผลไฟไหม้จากตัวอย่างดังกล่าวในอดีตแทนที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ของไทยจะเป็นผู้พัฒนายาจากพืชสมุนไพรจำหน่ายแก่ประชาชนแต่กลับกลายเป็นโรงงานไบเออร์ของเยอรมันตะวันตกที่นำหัวดองดิงส์ไปผลิตยารักษาโรครูมาติซึมจำหน่ายทั่วโลก กรณีไบหนูมานประสานกายและไบเปล้าน้อยก็เช่นกัน บริษัทยาของประเทศญี่ปุ่นเป็นผู้ผลิตยาออกจำหน่ายและจดลิขสิทธิ์เป็นของตน ปัจจุบันกองวิจัยและพัฒนาสมุนไพรกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และองค์การเภสัชกรรมศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรมากขึ้น จนกระทั่งมีการพัฒนาสมุนไพรออกจำหน่ายแพร่หลายกว่าเดิม เช่น ยาเม็ดมะแว้งอมแก้เจ็บคอ และสลายเสมหะหรือขมิ้นชันรักษาโรคระเพาะและบำบัดอาการท้องอืดท้องเฟ้อ นับเป็นนิมิตหมายอันดีสำหรับการพัฒนายาจากพืชสมุนไพรของไทย (วันทนี, 2542)

2.2 ความสำคัญของพืชสมุนไพร

การศึกษาถึงความสำคัญของพืชสมุนไพรมีรากฐานการศึกษามาตั้งแต่สมัยโบราณเริ่มต้นจากการที่มนุษย์ศึกษาค้นคว้าแสวงหาพืชและสัตว์เพื่อนำมาเป็นอาหาร ต่อจากนั้นจึงเกิดความรู้สามารถจำแนกได้ว่าพืชชนิดใดมีพิษชนิดใดไม่มีพิษชนิดใดนำมารับประทานได้ชนิดใดไม่ควรนำมารับประทานเพราะจะทำให้เกิดโทษหรือเป็นอันตราย โดยความรู้เหล่านี้ค่อยๆ พัฒนามาเป็นความรู้เกี่ยวกับสารที่เป็นตัวยารักษาโรคซึ่งได้จากธรรมชาติและพืชสมุนไพร มีการถ่ายทอดความรู้ต่อมาสมัยแรกๆ อาศัยการบอกเล่าจนกระทั่งใช้การบันทึกลงบนสิ่งของเช่น บันทึกลงบนกระดาษปาปิรุส แผ่นดินเผา แผ่นหนังสัตว์จนเขียนเป็นเอกสารเกี่ยวกับพืชสมุนไพรต่อมาได้มีการพิมพ์ในที่สุดจึงมีการจัดหรือเขียนเป็นเภสัชตำรับขึ้น สำหรับความสำคัญของพืชสมุนไพรในเรื่องหลักๆ ได้แก่ การใช้เป็นอาหาร ใช้เป็นยา ใช้เป็นวัตถุดิบเบื้องต้นในการสกัดสารเคมีหรือน้ำมันหอมระเหยเพื่อใช้สำหรับการ

ผลิตยา ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม อาหาร และเครื่องสำอาง ตลอดจนใช้ในการปรุงแต่งรส กลิ่น สี ของอาหารได้เช่นเดียวกับพืชเครื่องเทศ พืชหลายชนิดเป็นได้ทั้งเครื่องเทศและสมุนไพร เช่น มะกรูด และขมิ้น เป็นต้น (วันทนีย์, 2542)

2.3 สมุนไพรไทยที่ใช้ในการวิจัย

2.3.1 ว่านน้ำ



รูปที่ 2.3.1 ว่านน้ำ

ที่มา: <http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=124> (10 พฤศจิกายน 2557)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Acorus calamus* Linn.

ชื่อพ้อง *Acorus calamus* Line. Var. *virus* Linn.

ชื่อสามัญ Sweet Flag, Calamus

วงศ์ Araceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ว่านน้ำเป็นพืชที่ขึ้นอยู่ในโคลนเลน ตามริมบ่อ หนอง บึง แม่น้ำจะท่วมมิดใบตลอดฤดูน้ำท่วม 3 เดือนก็ไม่ตาย ใบมีรูปยาวเรียวคล้ายใบดาบฝรั่ง มีสีเขียวและค่อนข้างฉ่ำน้ำ เหง้ามีกลิ่นหอม มีรูปเป็นรูปทรงกระบอกที่ค่อนข้างแบน ภายนอกมีสีน้ำตาลอ่อนหรือน้ำตาลอมชมพู

ส่วนที่ใช้

เหง้า

สารสำคัญ

เหง้าประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 1.5-3.5 น้ำมันมีสีเหลืองและมีกลิ่นหอมในน้ำมันนี้ประกอบด้วยสาร asarone จำนวนมากและสาร sesquiterpenes และ sesquiterpene alcohol อยู่เล็กน้อย

ประโยชน์

เป็นยาเจริญอาหาร บำรุงธาตุ ขับลม แก้ท้องอืดท้องเฟ้อโดยใช้เหง้าสด 9-12 กรัม เหง้าแห้ง

6-9 กรัม ชงด้วยน้ำร้อน 2 ถ้วยด้วยน้ำร้อน 2 ถ้วยแก้วรับประทานครั้งละ 1 ถ้วยแก้ว ก่อนอาหารเย็น ติดต่อกัน (นิจศิริ และพยอม, 2534)

2.3.2 ข่า



รูปที่ 2.3.2 ข่า

ที่มา: <http://www.b2bthai.com/Search/Product/Detail/359348/ชาอบแห้ง> (10 พฤศจิกายน 2557)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Alpinia galangal* (L.) Willd.

ชื่อพ้อง *Alpinia galanga* SW.

ชื่อสามัญ Greater galangal

วงศ์ Zingiberaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ข่ามีลำต้นเป็นเหง้าที่มีข้อและปล้องเห็นได้ชัดเจนอยู่ใต้ดิน ส่วนที่อยู่บนดินอาจสูงได้ถึง 2 เมตร ใบเป็นแบบสลับ มีกาบใบหุ้มลำต้น ใบรูปรี เนื้อใบ 2 ข้างมักไม่เท่ากัน ปลายใบแหลมโคนใบคล้ายสามเหลี่ยม ดอกออกที่ยอดเป็นช่อยาว แต่ละดอกมีขนาดเล็ก เมื่อเป็นผล ผลมีรูปร่างรี ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ข่าของประเทศจีนมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *A. officinarum* Hance ชื่ออังกฤษ Lesser Galangal เรียก ข่าเมืองจีนหรือข่าเล็ก

ส่วนที่ใช้

เหง้าแห้ง

สารสำคัญ

เหง้าแก่สีน้ำตาลอมแสด กลิ่นหอมฉุนและรสขม มีน้ำมันอยู่ประมาณร้อยละ 0.04 น้ำมันประกอบด้วย methyl-cinnamate ร้อยละ 48 cineol ร้อยละ 20-30 การบูรและ α -pinene

ประโยชน์

แก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อและขับลม โดยใช้เหง้าขนาดเท่าหัวแม่มือ (สดประมาณ 5 กรัมแห้งประมาณ 2 กรัม) ทุบให้แตกต้มเอาน้ำ (นิจศิริ และพยอม, 2534)

2.3.3 โกงฐเชียง



รูปที่ 2.3.3 โกงฐเชียง

ที่มา: <http://www.thaihealth.or.th/Content/398-87.html> (10 พฤศจิกายน 2557)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Angelica sinensis*

ชื่อพ้อง *Angelica polymorpha*

ชื่อสามัญ Dong quai

วงศ์ Umbelliferae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นพืชล้มลุกขนาดเล็ก รากสดอวบหนา รูปทรงกระบอก แยกเป็นรากแขนงหลายราก รากแห้งรูปแกมทรงกระบอก ปลายแยกเป็นแขนง 3-5 แขนง หรือมากกว่า ยาว 15-25 เซนติเมตร ผิวนอกสีน้ำตาลอมเหลืองถึงน้ำตาล รากมีรอยย่นเป็นแนวตามยาว รอยช่องอากาศตามแนวขวาง ผิวไม่เรียบ มีรอยควั่นเป็นวงๆ มีขนาด 6-7 เซนติเมตร ยาวราว 4 เซนติเมตร มีรอยแผลเป็นของใบปรากฏอยู่ตอนบน มีรากแขนงยาวราว 10 เซนติเมตร และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 1.5 เซนติเมตร ตอนบนหนาตอนล่างเรียวเล็ก ส่วนมากบิด เนื้อเหนียว รอยหักสั้นและนิ่ม รอยหักของเหง้าแสดงว่ามีผิวหนามากเกือบถึงครึ่งเหง้า มีต่อมน้ำยางสีน้ำตาลหรือสีเหลืองแกมแดงออกเป็นแนวรัศมีจากกลางเหง้า ส่วนที่เป็นเนื้อมีสีเหลือง มีรูพรุน มีแกนสีขาว มีกลิ่นหอมแรงเฉพาะ ฉุน รสหวาน ขมและเผ็ดเล็กน้อย

ส่วนที่ใช้

ราก

สารสำคัญ

น้ำมันระเหยง่ายร้อยละ 0.4-0.7 สารหลักคือ alkylphthalides ในน้ำมันระเหยง่ายมีสารแซฟโรล (safrole) สารไอโซแซฟโรล (isosalfole) สารคาร์วาครอล (carvacrol) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น สารไลกัสติไลด์ (ligustilide) กรดเฟรูลิก (ferulic acid) กรดเอ็นวาเลอโรฟีนอนโอคาร์บอซิก (n-valerophenone-o-carboxylic acid) และยังพบสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ฟีนิลโพรพานอยด์ คูมาริน โพลีอะเซทิลีนประโยชน์กระตุ้นการไหลเวียนโลหิตได้ดีที่สุด ใช้เป็นยาบำรุงกำลัง ส่วนรากแขนงนั้นใช้เป็นยาขับประจำเดือน รักษาโรคเฉพาะสตรี เป็นยาขับประจำเดือน แก้กษัย แก้วขนกระดานไฟ เกี่ยวกับอาการเลือดออกทุกชนิด แก้วหวัด แก้วท้องขึ้นท้องเฟ้อ ตกมูกเลือด มีรสสุขุมหวาน แก้วไข้ สะอึก ไอเสียด เป็นเครื่องยาแก้โลหิตปกติโทษจากจิตใจ และยาแก้โลหิตปกติโทษที่มีสาเหตุจากชั้ว กระตุ้นการบีบตัวของกล้ามเนื้อกระเพาะปัสสาวะ ลำไส้ และมดลูก

ปกป้องตับ ปกป้องสมอง และไขสันหลัง เพิ่มการไหลเวียนของเลือด ป้องกันการแข็งตัวของเลือด กระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดง ด้านเนื้องอกและยับยั้งเซลล์มะเร็ง ด้านอนุมูลอิสระ ลดความกังวล กระตุ้นการสร้างเซลล์กระดูก ป้องกันการถูกทำลายโดยรังสี มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (สุदारัตน์, 2553: ออนไลน์)

2.3.4 โกรฐจุฬาลัมพา



รูปที่ 2.3.4 โกรฐจุฬาลัมพา

ที่มา: <http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=28> (10 พฤศจิกายน 2557)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Artemisia annua* Linn.

ชื่อพ้อง *Artemisia chamomilla* C. Winkler, *Artemisia stewartii* C.B. Clark, *Artemisia wadei* Edgeworth

ชื่อสามัญ Sweet wormwood

วงศ์ Compositae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

โกรฐจุฬาลัมพาเป็นพืชล้มลุก ที่แตกกิ่งก้านสาขามาก ใบออกสลับกัน ขอบใบหยักเว้าลึก ใบรูปค่อนข้างยาวเรียว ปลายใบแหลมด้านหลังใบเกลี้ยงแต่ด้านท้องใบสีขาวและมีขนปกคลุมอยู่ ช่อดอกออกที่ง่ามระหว่างใบกับลำต้น ประกอบด้วยดอกสีเหลืองจำนวนมากอัดกันอยู่บนช่อดอก

ส่วนที่ใช้

ใบ

สาระสำคัญ

ใบมีน้ำมันหอมระเหยอยู่ร้อยละ 0.02 น้ำมันมีส่วนประกอบดังนี้คือ cineol และ thoro นอกจากนี้ก็มี tannin, resinous matter, adenine และสารที่มีรสขมคือ artemisia

ประโยชน์

น้ำมันใช้ฆ่าแมลงและตัวอ่อนของแมลงได้ส่วนของพืชที่อยู่เหนือดินของโกรฐจุฬาลัมพาเข้าอยู่ในเภสัชตำรับของหลายประเทศในทวีปยุโรปในชวาและคาบสมุทรมมาเลเซียพืชนี้ทำภายนอก แก้วโรคผิวหนัง และแผลที่มีกลิ่นเหม็นเน่าในหลายประเทศใช้ยาชงของพืชนี้เป็นยาขับลม ขับกระดูก แก้อาการเกร็งในโรคประสาท (นิจศิริ และพยอม, 2534)

2.3.5 อบเชย



รูปที่ 2.3.5 อบเชย

ที่มา: <http://www.everydaymethailand.com/food/great-munu/sweet-cinnamo-th>
(10 พฤศจิกายน 2557)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cinnamomum verum* J. S. Presl.

ชื่อพ้อง *Cinnamomum zeylanicum* Garc. ex Bl.

ชื่อสามัญ Cinnamon

ชื่ออื่น อบเชยลังกา

วงศ์ Lauraceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

อบเชยเทศเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่สูงประมาณ 7-25 เมตร มีทั้งขึ้นเองและนำมาปลูก เปลือกลำต้นสีอมเทา ใบเดี่ยวออกตรงข้ามหรือเยื้องกันรูปขอบขนานแกมรีกว้างยาวประมาณ 5-10 และ 15-30 เซนติเมตร ปลายใบมนแหลม โคนใบแหลม ขอบใบเรียบเนื้อใบหนาคล้ายแผ่นหนัง มีเส้นใบจากโคนใบถึงปลายใบ 3 เส้นมองเห็นชัด เส้นใบย่อยมองไม่ชัดด้านท้องใบสีออกนวล เส้นใบนูนชัด ก้านใบยาวประมาณ 12-18 มิลลิเมตร ดอกออกเป็นช่อใหญ่แตกแขนง หนาแน่นใกล้ปลายยอด ช่อดอกยาวประมาณ 20-25 เซนติเมตร ก้านช่อยาว 10-15 เซนติเมตร ดอกย่อยมีก้าน ดอกยาว 2-5 มิลลิเมตร มีขน ดอกย่อยเล็กสีขาวอมเหลืองนวล กลีบเลี้ยงเชื่อมเป็นหลอดแยกตรงปลาย 6 กลีบ ติดอยู่คงทนจนกระทั่งผลเติบโต เกสรเพศผู้มี 9 อัน เรียง 3 วง ผลยาวกลมรีขนาด 7-12 มิลลิเมตร อวบน้ำ อบเชยที่ปลูกคุณภาพของเปลือกจะดีกว่าอบเชยที่ขึ้นตามธรรมชาติ

ส่วนที่ใช้

เปลือกด้านใน ใบและกิ่งก้าน

สารสำคัญ

ในเปลือกต้นกลิ่นไอน้ำได้น้ำมันที่มี eugenol เป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 13 น้ำมันที่กลั่นได้ใหม่ ๆ มีสีเหลือง แต่ถ้าเก็บไว้นานจะเปลี่ยนเป็นสีแดง น้ำมันจากใบจะมีรสเผ็ด สารสำคัญอื่นๆ

ได้แก่ cinnamaldehyde, benzaldehyde, methyl amyl ketone, phellandrene, pinene, linalool และ cumic aldehyde เป็นต้น (วันทนีย์, 2542)

2.3.6 ว่านนางคำ



รูปที่ 2.3.6 ว่านนางคำ

ที่มา: <http://charoensuk-osod.com/osod.php> (10 พฤศจิกายน 2557)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Curcuma aromatica* Salisb.

ชื่อสามัญ Wild turmeric

วงศ์ Zingiberaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นไม้ล้มลุก มีเหง้าและหัวสีเหลืองอยู่ใต้ดิน มีลำต้นแทงขึ้นมาจากหัว หัวมีกลิ่นหอม แตกแขนงเป็นแงะคล้ายขมิ้นชัน เนื้อในเมื่อหักดูจะมีสีเหลืองเข้มหรือสีทองดูสวยงาม ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการแยกหัวไปปลูก มีใบเป็นใบเดี่ยว ออกเป็นกระจุกใกล้กับราก ประมาณ 5-7 ใบ ลักษณะของใบเป็นรูปหอกกว้าง ปลายใบเรียวแหลม ใต้ท้องใบมีขน ใบมีความกว้างประมาณ 10-14 เซนติเมตร และยาวประมาณ 40-70 เซนติเมตร เป็นไม้ล้มลุก มีเหง้าและหัวสีเหลืองอยู่ใต้ดิน มีลำต้นแทงขึ้นมาจากหัว หัวมีกลิ่นหอม แตกแขนงเป็นแงะคล้ายขมิ้นชัน เนื้อในเมื่อหักดูจะมีสีเหลืองเข้มหรือสีทองดูสวยงาม ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการแยกหัวไปปลูก มีใบเป็นใบเดี่ยว ออกเป็นกระจุกใกล้กับราก ประมาณ 5-7 ใบ ลักษณะของใบเป็นรูปหอกกว้าง ปลายใบเรียวแหลม ใต้ท้องใบมีขน ใบมีความกว้างประมาณ 10-14 เซนติเมตร และยาวประมาณ 40-70 เซนติเมตร ออกดอกเป็นช่อเชิงลด มักมีดอกก่อนใบงอกจากเหง้า มีช่อดอกยาวประมาณ 5-8 เซนติเมตร มีใบประดับที่ปลายช่อมีสีชมพู ใบประดับที่รองรับมีดอกสีขาวแกมสีเขียว ปลายโค้งยาวได้ถึง 6 เซนติเมตร ส่วนใบประดับย่อยมีสีขาว ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร มีกลีบเลี้ยงยาวประมาณ 2 เซนติเมตร กลีบดอกมีสีขาวแกมชมพู แฉกกลางเป็นรูปไข่กว้าง แฉกข้างเป็นรูปขอบขนาน กลีบปากเป็นรูปโล่แยกเป็น 3 แฉก มีสีเหลืองเข้ม

ส่วนที่ใช้

เหง้า

สารสำคัญ

มีน้ำมันหอมระเหยอยู่หลายชนิด และมีสารกลุ่ม curcuminoids ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ
ประโยชน์

มีสรรพคุณช่วยกระตุ้นพืชต่างๆ ในร่างกาย ช่วยแก้พิษจากวุ้นร้ายต่างๆ แก้อาการของวุ้นร้ายทั้งปวง เพราะวุ้นร้ายจัดเป็น “พญาวุ้น” มีน้ำมันหอมระเหยจากวุ้นร้ายต่างๆ มีสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ หัวและรากวุ้นร้าย สรรพคุณช่วยควบคุมธาตุในร่างกาย ใช้เป็นยาขับเสมหะ ส่วนหัวใช้เป็นยาขับลมในลำไส้ ลดกรดในกระเพาะช่วยแก้อาการปวดท้อง ถ่ายท้อง ด้วยการใช้น้ำสดนำมาผสมกับน้ำปูนใสกิน อาการจะค่อยๆ ทุเลาลง หรือจะกินหัวสดผสมกับเหล้าขาวก็ได้เช่นกัน ช่วยแก้กามโรค ช่วยรักษาโรคหนองในเรื้อรัง รากวุ้นร้าย สรรพคุณใช้เป็นยาสมานแผล ใช้ตำนำมาพอกช่วยแก้อาการฟกช้ำบวมตามร่างกาย ใช้ฝนแล้วนำมาทาแก้อาการเม็ดผื่นคัน (Prurigo) และโรคผิวหนังต่างๆ หรือใช้หัวตำผสมกับเหล้า 40 ดีกรีแล้วนำมาพอก ในตำราจีนใช้วุ้นร้ายเป็นยาฆ่าเชื้อ ฆ่าเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย ช่วยรักษาอาการข้อเคล็ด เคล็ดขัดยอก อาการปวดเมื่อยตามร่างกาย (พริ้นด์อทคอม, 2557: ออนไลน์)

2.3.7 วุ้นร้ายเต่าเกิด



รูปที่ 2.3.7 วุ้นร้ายเต่าเกิด

ที่มา: http://www.panmai.com/Warn/Warn_ARACEA_05.shtml (10 พฤศจิกายน 2557)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Homalomena aromatica* Schott.

ชื่อสามัญ Coll aromatic Roxb., Sugandh mantri

วงศ์ Araceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าอยู่ใต้ดิน ส่วนที่โผล่ขึ้นมาเหนือดินนั้นเป็นเพียงก้านใบและใบ ก้านใบยาว 30-40 เซนติเมตร ซึ่งจะชูใบแตกขึ้นมาบนผิวดิน ก้านใบสีเขียวแกมแดง ลักษณะกลมเรียวยาวเป็นรูปสามเหลี่ยม ปลายแหลม โคนใบเว้าเป็นรูปหัวใจ ขอบใบเรียบ ไม่มีจัก มีสีเขียวกว้าง

ประมาณ 10-15 เซนติเมตร ยาว 10-20 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อ แต่จะไม่มีก้านช่อดอกลักษณะของดอกจะคล้ายกับดอกบอนแต่มีขนาดเล็กกว่า ดอกสีเขียวยอมเหลือง ส่วนที่ใช้

เหง้า

ประโยชน์

หัวมีกลิ่นหอม นำมาบดเป็นผงใช้ผสมกับใบยาสูบและยานัตถุ์ได้ เมื่อนำมากลั่นด้วยไอน้ำจะได้น้ำมันหอมระเหยสีเหลือง นอกจากนี้หัวยังใช้ผสมกับเครื่องเทศใส่แกงทำให้มีรสหอมอีกด้วยทั้งต้นนำมาตำใช้ทาแก้โรคผิวหนัง (ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ, 2553: ออนไลน์)

2.3.8 เปราะหอม



รูปที่ 2.3.8 เปราะหอม

ที่มา: http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/siri/index.php?page=search_detail & medicinal_id=84 (10 พฤศจิกายน 2557)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Kaempferia galanga* Linn.

ชื่อสามัญ Cekor

วงศ์ Zingiberaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เปราะหอมเป็นพืชล้มลุกมีเหง้าทุกส่วนของพืชมีกลิ่นหอม ใบขึ้นมาจากเหง้าซึ่งอยู่ใต้ดิน นอกจากเหง้าแล้วเปราะหอมยังมีรากรูปทรงกระบอกอยู่ใต้ดินอีกด้วย ต้นหนึ่งประกอบด้วยใบ 2 ใบ แผลอยู่บนผิวดิน ใบค่อนข้างกลมถึงรูปไข่กว้าง ฐานใบกลมปลายใบแหลม กลีบดอกรูปร่างเป็นหลอด ยาวมีกลีบเลี้ยงรองรับ ในช่อดอกหนึ่งๆ ประกอบด้วยดอกเพียง 2-3 ดอก กลีบดอกตรงกลางไว้เป็นปากมีจุดสีชมพูปนม่วงอ่อนๆ ประอยู่

ส่วนที่ใช้

เหง้า

สารสำคัญ

หัวมีน้ำมันระเหย น้ำมันระเหยประกอบด้วย cinnamic acid, borneol, camphene, cineol และ anisic acid

ประโยชน์

เป็นเครื่องเทศและเครื่องยา ใบสดเป็นผักจิ้ม น้ำคั้นจากใบและเหง้าใช้ป้ายคอเพื่อบรรเทาอาการเจ็บคอ ใช้ล้างศีรษะ เพื่อป้องกันมิให้เกิดรังแค (นิจศิริ และพยอม, 2534)

2.3.9 กานพลู



รูปที่ 2.3.9 กานพลู

ที่มา: <http://frynn.com/กานพลู/> (10 พฤศจิกายน 2557)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Syzygium aromaticum*

ชื่อพ้อง *Caryophyllus aromatica* L. ; *Eugenia aromatica* (L.) Baill; *E. Caryophylla* (Spreng.) Bullock et Harrison; *E. caryophyllata* Thunb.

ชื่อสามัญ Clove

วงศ์ Myrtaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กานพลูเป็นพืชพื้นเมืองของหมู่เกาะ Molucca แต่ได้มีผู้นำไปปลูกในท้องถิ่นอีกหลายแห่ง เช่น Penang, Ambon, Pemba, Zanzibar, Sumatra, Madagascar หมู่เกาะอินดิสตะวันตก อินเดีย ศรีลังกา เป็นต้น กานพลูเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ที่แตกกิ่งก้านสาขาเป็นระเบียบ ใบออกตรงข้ามและมีจุดของต่อมน้ำมัน ใบยาวเรียว สีเขียวเข้มและเป็นมัน ดอกเมื่อยังอ่อนมีสีเขียว แต่เมื่อแก่มีสีแดงเข้ม (crimson) ช่อดอกเป็นแบบปลายตัดส่วนยอดของดอกอยู่ในระดับเดียวกัน ช่อดอกออกที่ยอดของลำต้นหรือกิ่ง การเก็บดอกมาใช้เป็นเครื่องเทศหรือยานิยมเก็บเมื่อดอกยังตูมอยู่ คือตอนที่เริ่มเปลี่ยนสีจากเขียวเป็นแดง กานพลูชอบอากาศร้อนและความชื้นสูง ต้องปลูกในที่ใกล้ทะเลจึงจะเจริญงอกงามดี

ส่วนที่ใช้

ดอกตูม

สารสำคัญ

กานพลูมีน้ำมันหอมระเหยอยู่ร้อยละ 14-20 galloannic ร้อยละ 10-13 นอกจากนี้ยังมี triterpene acid, oleanolic acid, vanillin สารจำพวก chromone น้ำมันกานพลูประกอบด้วย eugenol 70-90 เปอร์เซนต์ eugenolacetate และ caryophyllene

ประโยชน์

งานพลูช่วยย่อยอาหาร แก้อาเจียน ลำไส้ใหญ่อักเสบโดยเฉพาะในเด็กกินหลังอาหารแก้คลื่นไส้ อาเจียนใช้เป็นเครื่องเทศแต่งกลิ่นอาหารหลายชนิด ไล่กรอก หมูแฮม น้ำมัน งานพลูมีฤทธิ์ทำให้ซาเฉพาะที่ใส่ไฟเป็นรูปเพื่อระงับการปวดฟันใช้เป็นส่วนผสมในยาอมกลั้วคอ (นิจศิริ และพยอม, 2534)

2.4 น้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร

น้ำมันหอมระเหยเป็นสารระเหยที่มีความสอดคล้องกันน้ำมันที่สามารถพบได้ทั่วไปในพืชเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้องและมีสีแตกต่างกันตั้งแต่สีเหลืองอ่อนจนถึงสีเขียวมรกตและจากสีฟ้าเป็นสีแดงน้ำตาลเข้มซึ่งถูกสังเคราะห์โดยอวัยวะพืชและเก็บไว้ภายในเซลล์ต่างๆ หรือต่อมไทรโคม (Trichomes) ของพืช การสกัดน้ำมันหอมระเหยสามารถใช้ได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับส่วนต่างๆ ของพืชที่นำมาสกัด รวมถึงการกลั่นด้วยน้ำหรือไอน้ำ การสกัดด้วยตัวทำละลาย การใช้ความดัน การสกัดแบบซูเปอร์คริติคอลลูอิด (Super critical fluid extraction) การประเมินคุณภาพน้ำมันหอมระเหยมีหลายขั้นตอนที่รู้จักกันดีอย่างเช่น การใช้ประสาทสัมผัส การทดสอบทางเคมีกายภาพ และเทคนิคโครมาโทสเปกโทรสโกปี ในการวิเคราะห์น้ำมันจะใช้แก๊สโครมาโทกราฟีและแมสสเปกโตรมิเตอร์เป็นเทคนิคหลักซึ่งช่วยในการบ่งบอกรายละเอียดเกี่ยวกับลักษณะคุณภาพและเชิงปริมาณของน้ำมันหอมระเหย แนวทางที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยได้มีการตีพิมพ์โดยหลายสถาบันเช่น มาตรฐานสากลของยุโรป (European pharmacopoeia) องค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน (International Organization for Standardization, ISO) และองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ที่ได้มีไว้และต้องปฏิบัติตามเพื่อให้มั่นใจในคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยที่ดีและพืชที่นำมาใช้สกัด น้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนผสมที่ซับซ้อนที่ได้จากการสังเคราะห์สารประกอบระเหยโดยพืช ซึ่งส่วนใหญ่การสังเคราะห์สารประกอบระเหยมีสองกลุ่มหลักคือ สารประกอบกลุ่มเทอร์พีน (Terpenes), เทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) และสารประกอบกลุ่มอะโรมาติก (Aromatic) กับอะลิฟาติก (Aliphatic) โดยส่วนใหญ่ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำมันหอมระเหยจะพบในออกซิเจนเทอร์พีนอยด์ (Oxygenated terpenoids) เช่น แอลกอฮอล์ (Alcohols) และฟีนอลิกเทอร์พีน (Phenolic terpenes) ขณะที่สารประกอบไฮโดรคาร์บอนบางตัวยังมีการแสดงผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ (Yousef, 2014)

คำว่า “น้ำมันหอมระเหย” ได้ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกในศตวรรษที่ 16 โดย Paracelsus von Hohenheim เป็นผู้อ้างไว้ว่าเป็นส่วนประกอบที่มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นยา “Quinta essential” ได้นำน้ำมันหอมระเหยมาทำการทดลองฆ่าเชื้อแบคทีเรียเป็นครั้งแรกดำเนินการโดย De la Croix ในปี ค.ศ. 1881 และตั้งแต่นั้นมาการใช้ น้ำมันหอมระเหยในทางเวชกรรมก็ค่อยๆ ลดลง ในวิธีการกลั่นน้ำมันหอมระเหยนั้นมีการสกัดเป็นครั้งแรกในแถบตะวันออกเป็นครั้งแรก (ได้แก่ อินเดีย, อินเดี และเปอร์เซีย) มามากกว่า 2,000 ปีมาแล้ว และได้มีการปรับปรุงให้ดีขึ้นในศตวรรษที่ 9 โดยชาวอาหรับโดยศตวรรษที่ 13 น้ำมันหอมระเหยได้มีในร้านขายยาและผลทางเภสัชวิทยาได้อธิบายไว้ในตำหรับเภสัชแต่การใช้งานไม่ปรากฏว่าจะได้รับความนิยมแพร่หลายในยุโรปจนกระทั่งศตวรรษที่

16 ได้มีการซื้อขายในกรุงลอนดอน น้ำมันต้นขามีการนำมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ทางการแพทย์และได้รับการรับรองในประเทศออสเตรเลียในช่วงปลายศตวรรษที่ 18 มีการวัดการทดลองแรกของคุณสมบัติการฆ่าเชื้อแบคทีเรียผ่านไอระเหยของแบคทีเรียได้ดำเนินการโดย De la Croix ในปี ค.ศ. 1881 จากนั้นได้นำเสนอในช่วงต้นปี ค.ศ. 1960 และมีการอธิบายอย่างสมบูรณ์โดย López และคณะ (2005) เป็นเพียงการปรับเปลี่ยนอย่างง่ายของการทดสอบ disc diffusion ใช้สำหรับสารประกอบที่ไม่มีสารระเหยโดยแผ่นดิสก์จะถูกย้ายออกจากผิวหน้าอาหารวันไปยังฝั่งตรงข้ามบนฝาของจานเพาะเชื้อ ได้มีการนำน้ำมันหอมระเหยนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ที่หลากหลายเช่นผลิตภัณฑ์ทางทันตกรรม ยาฆ่าเชื้อโรคและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (Yousef, 2014)

2.5 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยเป็นกลุ่มของเทอร์พีนอยด์, เซสควิเทอร์พีน (Sesquiterpenes) หรือไดเทอร์พีน (Diterpenes) และอีกกลุ่มเป็นพวกอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (Aliphatic hydrocarbons) กรด แอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์ (Aldehydes) อะไซคลิกเอสเทอร์ (Acyclic esters) หรือ แลคโตน (Lactones) น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดอื่นๆ จากพืชที่มีความสำคัญสำหรับกิจกรรมการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ สารสกัดเหล่านี้สามารถได้จากพืชและเครื่องเทศโดยวิธีการต่างๆ เช่น การใช้ไอน้ำ การใช้ความเย็น การทำแห้ง และการกลั่นสุญญากาศ สารประกอบจากพืชเหล่านี้รวมถึงกลูโคไซด์ (Glucosides) ซาโปนิน (Saponins) แทนนิน (Tannins) อัลคาลอยด์ (Alkaloids) น้ำมันหอมระเหย กรดอินทรีย์และอื่นๆ เป็นสารประกอบที่มีอยู่ในพืชอยู่แล้วซึ่งเป็นระบบช่วยในการป้องกันการติดเชื้อจุลินทรีย์ส่วนสารประกอบที่สำคัญของน้ำมันหอมระเหยนั้นมีถึงร้อยละ 85 และส่วนประกอบอื่นๆ มักจะมีที่ระดับรองลงมา (Burt, 2004; Grosso และคณะ, 2008)

น้ำมันหอมระเหยมีองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในพืชแตกต่างกันซึ่งเป็นแหล่งของยาต้านจุลินทรีย์รวมทั้งซาโปนิน (Saponin) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ไธโอซัลไฟเนท (Thiosulfonates) และกลูโคซิโนเลท (Glucosinolates) โดยที่ซาโปนินและฟลาโวนอยด์สามารถพบได้ในผัก ผลไม้ ถั่ว เมล็ด ลำต้น ดอก ชา ไวน์ พรอพอลิส และน้ำผึ้ง โดยทั่วไปจะอยู่ในรูปแบบฟองสบู่หลังจากที่นำไปเขย่าในน้ำ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของซาโปนินและฟลาโวนอยด์ในพืช เช่น ข้าวโอ๊ต (*Avena sativa*) และแอนทราควิโนน (Anthraquinones) คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates) และอัลคาลอยด์ (Tajkarimi และคณะ, 2010)

ไธโอซัลไฟเนทเตรียมได้จากกระเทียมมีกิจกรรมต้านจุลินทรีย์ที่แข็งแกร่งกับแบคทีเรียแกรมลบ (Kim และคณะ, 2008; Naidu, 2000; Yoshida และคณะ, 1999)

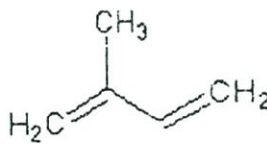
กลูโคซิโนเลทมีอยู่ในบรอกโคลี กะหล่ำดาว กะหล่ำปลี และผงมัสตาร์ด ซึ่งก่อให้เกิดรสชาติฉุนของมัสตาร์ดและฮอสเตรดิซ ซึ่งมีความหลากหลายของการต้านเชื้อแบคทีเรียและคุณสมบัติในการต้านเชื้อราอาจมีผลโดยตรงหรือมีผลเมื่อได้ทำงานร่วมกันกับสารอื่นๆ (Almajano และคณะ, 2008;

Graumann และ Holley, 2008; Gutierrez และคณะ, 2008; Naidu, 2000; Tolonen และคณะ, 2004)

โดยทั่วไปแล้วสารประกอบฟีนอลิกของน้ำมันหอมระเหยเช่นน้ำมันที่สกัดจากส้ม มะนาว น้ำมันมะกอกมีสารโอลีโรเปอีน (Oleuropein) น้ำมันต้นชา มีสารเทอร์พีนอยด์ ส้มและมะกรูดมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่กว้างและไม่ได้จัดหมวดหมู่ว่าเป็นเครื่องเทศ ในขณะเดียวกันมีรายงานเพิ่มของสารที่ไม่ใช่ฟีนอลิก (Non-phenolic) ของน้ำมันที่สกัดได้จากออริกาโน กานพลู อบเชย ตะไคร้ กระเทียม ผักชี โรสแมรี่ ผักชีฝรั่ง เมล็ดมัสคาดีน และเซจ เป็นต้น ซึ่งมีผลกับทั้งสองกลุ่มของแคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ (Tajkarimi และคณะ, 2010)

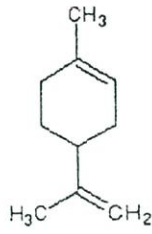
2.6 โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยองค์ประกอบทางเคมีที่มีความหลากหลาย องค์ประกอบพื้นฐานของน้ำมันหอมระเหยเรียกว่าไอโซพรีน (Isoprene) ประกอบด้วยคาร์บอนจำนวน 5 อะตอม (รูปที่ 2.6.1) เมื่อนำไอโซพรีน 2 ตัวมาเชื่อมกันจะเกิดเป็นที่มีคาร์บอนจำนวน 10 อะตอม เรียกสารนี้ว่าโมโนเทอร์พีน (Monoterpenes) ซึ่งมีทั้งในรูปของสารที่เรียงตัวแบบเป็นวง (Cyclic chain) เช่น limonene, α -terpineol, γ -terpinene, α -phellandrene, thymol, menthol, carveol และเรียงตัวแบบไม่เป็นวง (Acyclic chain) เช่น citronellal, β -myrcene, ocimene, lavandulol, linalool (รูปที่ 2.6.2 และ 2.6.3) ถ้านำไอโซพรีน 3 ตัวมาเชื่อมกันจะเกิดเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอนจำนวน 15 อะตอม เรียกสารนี้ว่า sesquiterpenes เช่น humulene, guaiol, farnesol, zingiberene, caryophyllene, α -bisabolene (รูปที่ 2.6.4) ถ้านำไอโซพรีน 4 ตัวมาเชื่อมกันจะเกิดเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอนจำนวน 20 อะตอม เรียกสารนี้ว่าไดเทอร์พีน จะไม่ค่อยพบในน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำเนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลสูงเกินกว่าที่วิธีการกลั่นจะแยกสารออกมาได้ (ฐาปนีย์, 2550)

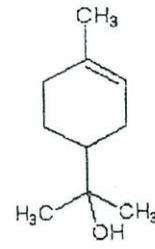


รูปที่ 2.6.1 Isoprene unit

ที่มา: Price (2007)

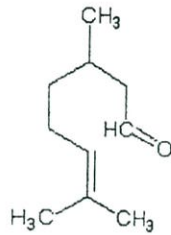


Limonene

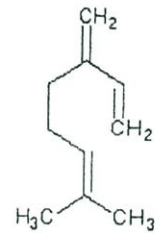


α -Terpineol

รูปที่ 2.6.2 Monoterpenes ชนิดเรียงตัวแบบเป็นวง
ที่มา: Price (2007)

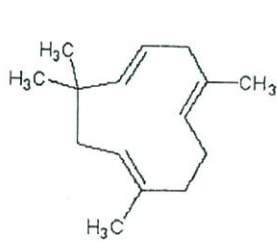


Citronellal

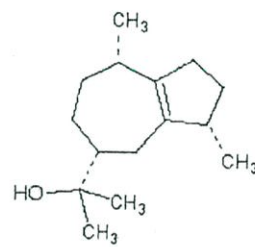


β -Myrcene

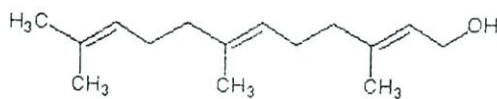
รูปที่ 2.6.3 Monoterpenes ชนิดเรียงตัวแบบไม่เป็นวง
ที่มา: Price (2007)



Humulene



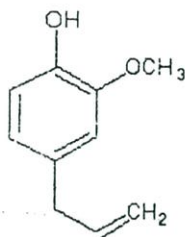
Guaiol



Farnesol

รูปที่ 2.6.4 Sesquiterpenes
ที่มา: Price (2007)

องค์ประกอบพื้นฐานของน้ำมันหอมระเหยอีกกลุ่มหนึ่งเป็นสารที่ประกอบด้วยคาร์บอนจำนวน 6 อะตอมและเรียงตัวเป็นวงซึ่งอาจอยู่ในรูปของวงอะโรมาติก (Aromatic ring) วงเบนซีน (Benzene ring) หรือวงฟีนิล (Phenyl ring) ถ้าสารอยู่ในรูปวงอะโรมาติกและมีกิ่งที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 จะเรียกลักษณะนี้ว่าฟีนิลโพรเพน (Phenylpropanes) (รูปที่ 2.6.5) (ฐาปนีย์, 2550)



Eugenol

รูปที่ 2.6.5 Phenylpropanes

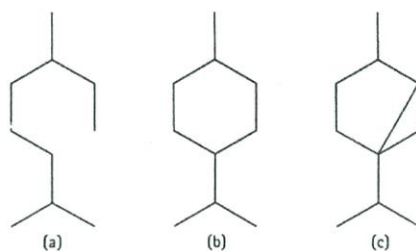
ที่มา: Price (2007)

2.7 น้ำมันหอมระเหยแบ่งตามองค์ประกอบทางเคมี

น้ำมันหอมระเหยแบ่งตามองค์ประกอบทางเคมีได้ 3 ประเภท ดังนี้

2.7.1 Monoterpenes essential oil แบ่งกลุ่มได้ดังนี้

2.7.1.1 Monoterpene hydrocarbon essential oils เป็นน้ำมันหอมระเหยที่มีโมโนเทอร์พีนไฮโดรคาร์บอนเป็นองค์ประกอบซึ่งมีจำนวนคาร์บอน 10 อะตอม (รูปที่ 2.7.1.1a) เป็นโมเลกุลของไอโซพรีน 2 โมเลกุลรวมกันโดยทั่วไปประกอบด้วยชนิดของเทอร์พีนที่มีอยู่ในพืชซึ่งเป็นน้ำมันระเหยง่ายและเกิดจากการพรมตัวเป็นลูป (รูปที่ 2.7.1.1b) จึงทำให้มีลักษณะที่เป็นวง แต่ยังมีไอโซพรีน 2 โมเลกุล และคาร์บอนจำนวน 10 อะตอมเท่าเดิมภายในสาย เมื่อเทอร์พีนมีการเกิดลูปขึ้นจึงเรียกว่าเป็นโมโนไซคลิก (Monocyclic) เนื่องจากมีการสร้างเป็นวงเกิดขึ้น ดังนั้นจึงสามารถเรียกอีกอย่างว่าโมโนไซคลิกโมโนเทอร์พีน (Monocyclic monoterpene) หากในสายพอลิเมอร์มีวงเกิดขึ้นที่มากกว่า 1 วงกลม เช่น มี 2 วง จะเรียกว่าไบไซคลิกโมโนเทอร์พีน (Bicyclic monoterpene) หากมี 3 วง จะเรียกว่าไตรไซคลิกโมโนเทอร์พีน (Tricyclic monoterpene) (Price, 2007)

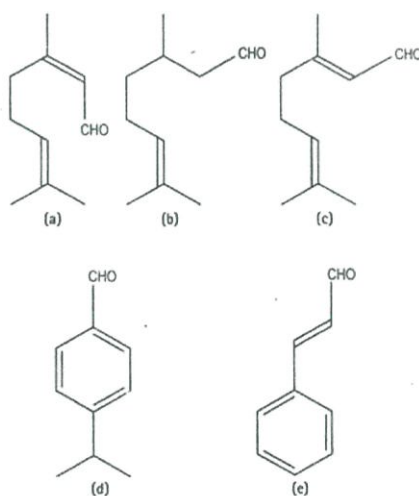


รูปที่ 2.7.1.1 Monoterpenes: 2 isoprene รวมกันเป็น monoterpene

(a) An acyclic monoterpene; (b) a monocyclic monoterpene; (c) a bicyclic monoterpene (thujane)

ที่มา: Price (2007)

2.7.1.2 Aldehyde essential oils เป็นน้ำมันหอมระเหยที่มีแอลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบ เกิดจากคาร์บอนิล ($=O$) รวมกับอะตอมไฮโดรเจน ($-H$) จับกับคาร์บอน 1 อะตอม เกิดเป็นหมู่ $-CHO$ (รูปที่ 2.7.1.3) การเรียกชื่อแอลดีไฮด์จะลงท้ายด้วยคำว่า $-al$ องค์ประกอบเคมีในน้ำมันหอมระเหยที่มีแอลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ neral, citral, cuminal, citronellal และ geranial หรือเรียกชื่อลงท้ายด้วยแอลดีไฮด์ เช่น cinnamic aldehyde (Price, 2007)

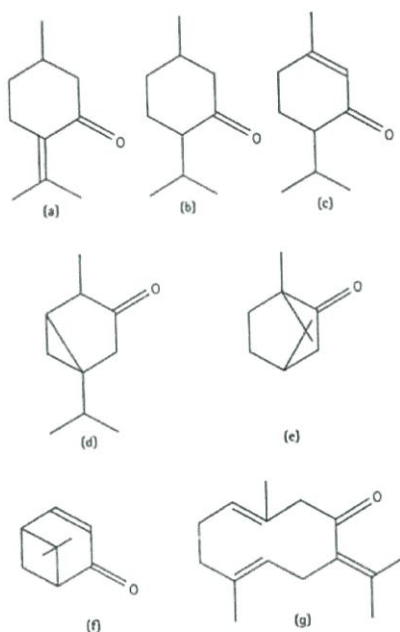


รูปที่ 2.7.1.2 Aldehydes

(a) An acyclic monoterpene aldehyde (neral); (b) an acyclic monoterpene aldehyde (citronellal); (c) an acyclic monoterpene aldehyde (geranial); (d) an aromatic aldehyde (cuminal); (e) an aromatic aldehyde (cinnamal)

ที่มา: Price (2007)

2.7.1.3 Ketone essential oils เป็นน้ำมันหอมระเหยที่มีคีโตนเป็นองค์ประกอบ เป็นหมู่คาร์บอนิล (=O) ที่จับกับคาร์บอนภายในสายโครงสร้าง เป็นอะลิฟาติกคีโตน (Aliphatic ketone) (รูปที่ 2.7.1.3) เกิดเป็นวงของคีโตนซึ่งแทบจะไม่มีในน้ำมันหอมระเหย การเรียกชื่อคีโตนจะลงท้ายด้วยคำว่า -one องค์ประกอบเคมีในน้ำมันหอมระเหยที่มีคีโตนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ carvone, menthone, pipertone, pulegone, germacrone, camphor และ β -thujone (Price, 2007)

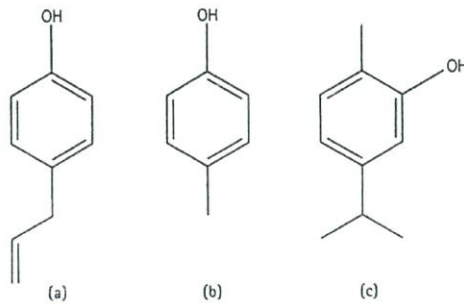


รูปที่ 2.7.1.3 Ketone

(a) A monocyclic monoterpenone (pulegone); (b) a monocyclic monoterpenone (menthone); (c) a monocyclic monoterpenone (pipertone); (d) a bicyclic monoterpenone (thujone); (e) a bicyclic monoterpenone (camphor); (f) a bicyclic monoterpenone (verbenone); (g) a monocyclic sesquiterpenone (germacrone)

ที่มา: Price (2007)

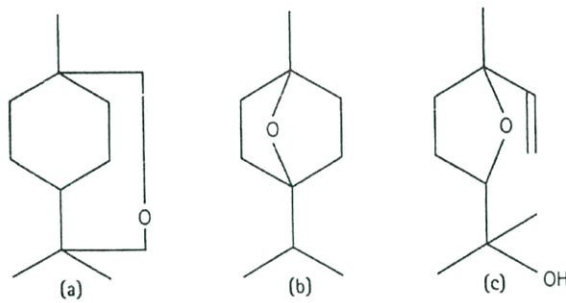
2.7.1.4 Phenolic essential oils เป็นน้ำมันหอมระเหยที่มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบเป็นหมู่ไฮดรอกซิลที่จับกับคาร์บอนในวงอะโรมาติก (ฟีนิลกับเบนซีน) โมเลกุลของฟีนอลที่รู้จักกัน (รูปที่ 2.7.1.4) ซึ่งอาจเรียกว่าอะโรมาติกแอลกอฮอล์ (Aromatic alcohol) ฟีนอลจะเหมือนกับแอลกอฮอล์ใช้เป็นยาฆ่าเชื้อโรคและแบคทีเรีย ยังช่วยกระตุ้นทั้งระบบประสาท (ใช้กับผู้ป่วยโรคซึมเศร้า) และระบบภูมิคุ้มกันการเรียกชื่อฟีนอลจะลงท้ายด้วยคำว่า -ol องค์ประกอบเคมีในน้ำมันหอมระเหยที่มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ carvacrol, thymol และ chavicol (Price, 2007)



รูปที่ 2.7.1.4 Phenols (a) Chavicol; (b) p-cresol; (c) carvacrol

ที่มา: Price (2007)

2.7.1.5 Oxide/Peroxide essential oils เป็นน้ำมันหอมระเหยที่มีออกไซด์หรือเพอร์ออกไซด์เป็นองค์ประกอบ (รูปที่ 2.7.1.5) เช่น 1,8-cineole เป็นที่รู้จักกันว่าเป็น eucalyptol อาจถือได้ว่าเป็น bicyclic ether (Price, 2007)

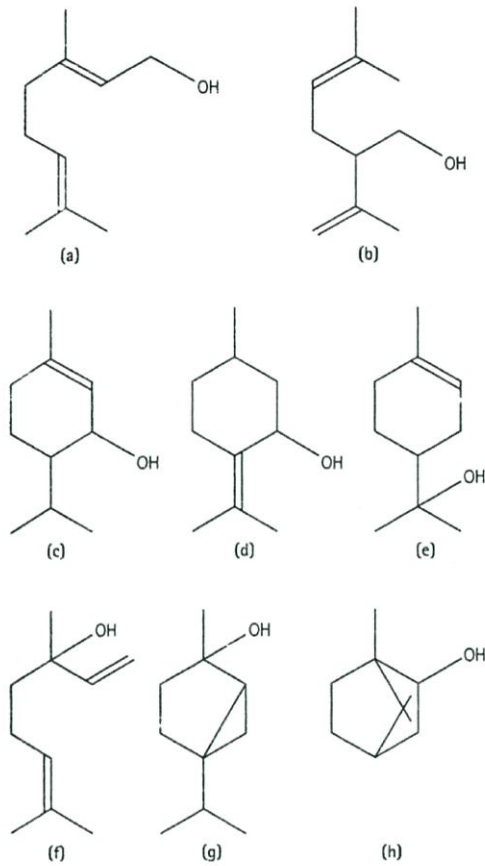


รูปที่ 2.7.1.5 Oxides

(a) 1,8-cineole; (b) 1,4- cineole; (c) linalool oxide

ที่มา: Price (2007)

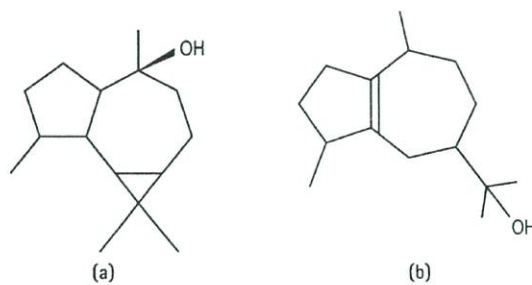
2.7.1.6 Alcohol essential oils เป็นน้ำมันหอมระเหยที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบเป็นหมู่ไฮดรอกซิลประกอบด้วยออกซิเจน 1 อะตอม และไฮโดรเจน 1 อะตอม (-OH) จับกับคาร์บอน 1 อะตอมในสายโครงสร้างโดยมีการกำจัดไฮโดรเจนออก 1 โมเลกุล ได้เป็นรูปแบบของแอลกอฮอล์ (รูปที่ 2.7.1.6.1, 2.7.1.6.2 และ 2.7.1.6.3) เป็นรูปแบบ monoterpenic alcohol, sesquiterpenic alcohol หรือ diterpenic alcohol ขึ้นอยู่กับการจับกันในสายของมันเองว่ามี 2, 3 หรือ 4 โมเลกุลไอโซพรีน การเรียกชื่อแอลกอฮอล์จะลงท้ายด้วยคำว่า -ol องค์ประกอบเคมีในน้ำมันหอมระเหยที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ thymol, lavendulol, borneol, carveol, linalool, citronellol, geraniol, menthol และ terpineol (Price, 2007)



รูปที่ 2.7.1.6.1. Alcohols-monoterpenols (10 C)

(a) An acyclic monoterpene (geraniol); (b) an acyclic monoterpene (lavandulol); (c) a monocyclic monoterpene (piperitol); (d) a monocyclic monoterpene (pulegol); (e) a monocyclic monoterpene (α -terpineol); (f) an acyclic monoterpene (linalool); (g) a bicyclic monoterpene (thujanol-4); (h) a bicyclic monoterpene (borneol)

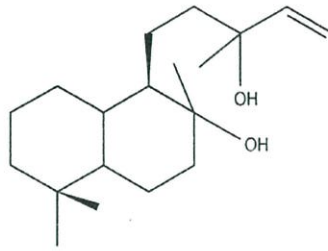
ที่มา: Price (2007)



รูปที่ 2.7.1.6.2 Alcohols-sesquiterpenols (15 C)

(a) A bicyclic sesquiterpene (viridiflorol); (b) a bicyclic sesquiterpene (guaiol)

ที่มา: Price (2007)



รูปที่ 2.7.1.6.3 Alcohols-diols (20 C)

Bicyclic diol (sclareol)

ที่มา: Price (2007)

2.7.1.7 Ester essential oils เป็นน้ำมันหอมระเหยที่มีเอสเทอร์เป็นองค์ประกอบ เกิดจากการจับกันของกรดอินทรีย์กับแอลกอฮอล์ ดังสมการ



ปฏิกิริยาเคมีนี้อาจเกิดขึ้นในสัตว์ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการแลกเปลี่ยนกันจากกรดไปเป็นเอสเทอร์และจะกลับมาเป็นกรดอีกครั้ง ด้วยเหตุนี้อาจเป็นเหตุผลที่เอสเทอร์ (รูปที่ 2.7.1.7.2) มีประโยชน์สำหรับ normalizing ในบางสภาวะของทางอารมณ์และร่างกายที่ไม่สมดุล การเรียกชื่อเอสเทอร์จะลงท้ายด้วยคำว่า -ate องค์ประกอบเคมีในน้ำมันหอมระเหยที่มีเอสเทอร์เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ linalyl acetate, benzyl acetate, methyl salicylate และ bornyl acetate (Price, 2007)

2.7.2 Sesquiterpenes essential oils แบ่งกลุ่มได้ดังนี้

Sesquiterpene alcohol essential oils เป็นน้ำมันหอมระเหยที่มี sesquiterpene alcohol เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ bisabolol, zingiberol, patchouli alcohol และ santalol เป็นต้น (ฐาปนีย์, 2550)

Sesquiterpenes essential oils เป็นน้ำมันหอมระเหยที่มี sesquiterpene เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ chamazulene และ caryophyllene เป็นต้น (ฐาปนีย์, 2550)

2.7.3 Phenylpropanes essential oils แบ่งกลุ่มได้ดังนี้

Eugenol/Cinnamic aldehyde พบในน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู อบเชยจีน อบเชยลังกา น้ำมันหอมระเหยกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย และชาเฉพาะที่ (Local anesthetic) (ฐาปนีย์, 2550)

Anethole/Estragole พบในน้ำมันหอมระเหยจันทร์เทศ โหระพา เทียนสัตตบุศย์ เป็นต้น น้ำมันหอมระเหยกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการแก้แกร็ง (ฐาปนีย์, 2550)

2.8 ฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหย

ปัจจุบันการบำบัดด้วยสารที่มีกลิ่นหอมหรือบำบัดด้วยน้ำมันหอมระเหยเป็นที่รู้จักกันมากในชื่อสுகอนบำบัด ซึ่งเป็นที่นิยมแพร่หลายในประเทศไทยและต่างประเทศ มีการนำน้ำมันหอมระเหยในรูปแบบที่หลากหลายมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ เช่น นำมาใช้บำบัดผู้ป่วยที่มีสภาวะทางจิตผิดปกติ ผู้ป่วยที่มีความจำเสื่อม ใช้เป็นการแพทย์ทางเลือกในผู้ป่วยโรคมะเร็ง มีการนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางต่างๆ ฤทธิ์ทางชีวภาพจะเป็นในเรื่องของฤทธิ์ต่อระบบประสาทกลางและระบบประสาทอัตโนมัติ ได้แก่ กระตุ้นระบบประสาท สงบประสาท ช่วยให้ผ่อนคลาย คลายกังวล คลายเครียด แก้อาการเป็นต้น ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial) เช่น ต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านไวรัส เป็นต้น ฤทธิ์ต่อระบบทางเดินอาหาร ฤทธิ์ต่อระบบทางเดินหายใจ ฤทธิ์ต่อระบบกล้ามเนื้อและข้อต่อ ฤทธิ์ต่อระบบไหลเวียนเลือด หัวใจและหลอดเลือด ฤทธิ์ต่อระบบต่อมไร้ท่อและฮอร์โมน ฤทธิ์ไล่แมลง ช้ำแมลง ช้ำปรสิต และฆ่าหอนพยาธิเป็นต้น ปัจจุบันข้อมูลทางวิทยาศาสตร์มีอยู่ไม่มากนักบางส่วนเป็นการบอกเล่าต่อๆ กันมา (ฐาปนีย์, 2550)

2.8.1 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial effects)

น้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ได้แก่ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านไวรัส

2.8.1.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

องค์ประกอบสำคัญของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ได้แก่

2.8.1.1.1 สารประกอบฟีนอล เช่น carvacrol และ thymol เป็นสารกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียสูง

2.8.1.1.2 สารประกอบแอลดีไฮด์ เช่น citral และ citronellal

2.8.1.1.3 สารประกอบแอลกอฮอล์ เช่น linalool และ cineol สารกลุ่มนี้จะทำลายโปรตีนของเชื้อแบคทีเรียทำให้เชื้อตาย

2.8.1.1.4 สารประกอบเอสเทอร์ เช่น geranyl acetate

2.8.1.1.5 สารประกอบคีโตน เช่น menthone และ carvone

2.8.1.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อราและยีสต์

ในบางชนิดของน้ำมันหอมระเหยแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของผลกระทบของสารกำจัดเชื้อราที่เป็นสารธรรมชาติในการต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวโดยเฉพาะในทางชีวภาพจะทำการใช้ไธราเฮนสำหรับการจัดเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร (Tripathi และคณะ, 2008) อย่างไรก็ตามการให้ไธราเฮนต้องใช้เวลานานซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับผลทางชีวภาพดังนั้นอาหารจะสามารถดูดซึมไธราเฮนได้มากขึ้น (Fisher และ Phillips, 2008) กิจกรรมการต้านเชื้อรามีผลกระทบต่อสรีรวิทยาของเชื้อรา ดังนั้นเชื้อราแต่ละชนิดจึงให้ผลของกิจกรรมการต้านเชื้อราแตกต่างกัน (Daferera และคณะ, 2000)

มีรายงานสารประกอบที่มีประสิทธิภาพต่อต้านเชื้อราที่ทำให้อาหารเสียรวมทั้ง *Aspergillus niger*, *A. flavus* และ *A. parasiticus* คือสารสกัดกัวรานา (Majhenič และคณะ, 2007) การเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* และการผลิต Aflatoxins สามารถยับยั้งได้โดยน้ำมันโรม์ (*Thymus vulgaris*) และน้ำมันมะนาว (*Citrus aurantifolia*) ในขณะที่น้ำมันสะระแหน่ (*Mentha spicata* L.) น้ำมันเทียนข้าวเปลือก (*Foeniculum miller*) น้ำมันสะเดา (*Azadirachta indica* A. Juss) น้ำมันเฮมล็อก (*Conium maculatum*) และน้ำมันทารากอน (*Artemisia dracunculus*) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ในขณะที่น้ำมันเทียนตากบ (*Carum carvi* L.) สามารถควบคุมการผลิตอะฟลาท็อกซินโดยเชื้อราได้แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ (Razzaghi-Abyaneh และคณะ, 2009) องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมัน เช่น oleoresin และ cinnamic aldehyde ที่ได้จากน้ำมันอบเชยและ eugenol ที่ได้จากน้ำมันกานพลูพบว่ามีผลในการยับยั้งสารพิษที่สร้างขึ้นโดยเชื้อรา *Aspergillus* และ *Penicillium* ที่ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Davidson และ Naidu, 2000)

2.8.1.3 ฤทธิ์ต้านไวรัส

ปัจจุบันการศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสของน้ำมันหอมระเหยยังไม่มีมาก องค์ประกอบสำคัญของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้าน Herpes simplex ได้แก่ anethole, β -caryophyllene, carvone, cinnamic aldehyde, citronellol, eugenol, limonene, linalyl acetate, α -sabinene และ γ -terpinene น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณสมบัติต้านไวรัส เช่น น้ำมันอบเชยจีน น้ำมันอบเชยลังกา น้ำมันเปปเปอร์มินท์ น้ำมันมะนาว น้ำมันโรม์ น้ำมันทีทรี น้ำมันขิง และน้ำมันเจอรานิยม เป็นต้น (ฐาปนีย์, 2550)

2.9 กลไกการทำงานการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย

2.9.1 กลไกการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ได้มีรายงานการศึกษาแสดงให้เห็นถึงผลการต้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยโดยน้ำมันหอมระเหยทำให้เกิดความเสียหายกับโครงสร้างและการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย มีรายงานแสดงให้เห็นว่าส่วนของ hydrophobicity จะถูกทำลายโดยน้ำมันหอมระเหย (Goñi และคณะ, 2009) โดยเครื่องเทศและสมุนไพรที่ใช้ส่วนใหญ่มีกิจกรรมต้านจุลินทรีย์อยู่ในช่วงระหว่าง 0.05-0.1 เปอร์เซ็นต์ (500–1000 ppm) ในระบบอาหาร บางเครื่องเทศมีกิจกรรมต้านจุลินทรีย์ที่แข็งแกร่งกว่าเครื่องเทศอื่นๆ และมีประสิทธิภาพที่ 1000 ppm อย่างไรก็ตามเครื่องเทศบางชนิดต้องใช้ความเข้มข้นสูง (Ceylan และ Fung, 2004) การประยุกต์ใช้ในยาต้านจุลินทรีย์โดยวิธีที่แตกต่างกัน เช่น การใช้ไอระเหยเมื่อเทียบกับวิธีการสัมผัสโดยตรงของมัสตาร์ดและน้ำมันหอมระเหยได้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างเด่นชัด (Goñi และคณะ, 2009) stereochemistry, lipophilicity และปัจจัยอื่นๆ ได้รับผลกระทบจากฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเหล่านี้ซึ่งอาจเป็นการเปลี่ยนแปลงในทางบวกหรือทางลบ ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางสรีระของจุลินทรีย์เล็กน้อย (Veluri และคณะ, 2004) ได้มี

การแสดงให้เห็นว่าสารในพืชส่งผลกระทบต่อเซลล์ของจุลินทรีย์โดยกลไกในการต้านจุลินทรีย์ต่างๆ รวมทั้งเข้าสารเหล่านั้นได้เข้าจับที่ phospholipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์จึงส่งผลกระทบต่อระบบการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เกิดการสูญเสียสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย และการสร้าง fatty acid hydroperoxidase ที่เกิดจากออกซิเจนของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Arques และคณะ, 2008; Burt และคณะ, 2007; Lanciotti และคณะ, 2004; Proestos และคณะ, 2008; Silva และคณะ, 2007; Skocibusic และคณะ, 2006)

โหมดหลักของการทำงานของน้ำมันหอมระเหย เป็นกระบวนการทำลายเสถียรภาพ (Destabilization) ของอนุภาคคอลลอยด์ในเมมเบรน โดยน้ำมันหอมระเหยเป็น lipophilic ในธรรมชาติและด้วยเหตุนี้จึงสามารถดูดซึมได้ง่ายผ่านผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ปฏิสัมพันธ์ของน้ำมันหอมระเหยและส่วนประกอบพวก polysaccharides, fatty acids และ phospholipids ทำให้ส่วนเมมเบรนแบคทีเรียดูดซึมได้มากขึ้นดังนั้นก็เกิดการสูญเสียไอออนและเนื้อสารของเซลล์ที่นำไปสู่การตายของเซลล์ (Edris, 2007; Saad และคณะ, 2013) ในทำนองเดียวกันการสอดแทรกของกิจกรรมโปรตอนปั๊มทำให้เกิดการสูญเสียความสมบูรณ์ของเมมเบรน และทำให้เซลล์รั่วไหลส่งผลให้เซลล์สูญเสียความมีชีวิต (Oussalah และคณะ, 2006; Pasqua และคณะ, 2007) การดำเนินการของกลไกที่สำคัญอื่นๆ รวมถึงการสูญเสียสภาพธรรมชาติของ cytoplasmic proteins และทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์ไม่ทำงานจึงนำไปสู่การตายของเซลล์แบคทีเรียที่เกิดจากสารประกอบในน้ำมันหอมระเหย กลุ่ม terpenoids ไปยับยั้งการทำงานของผนังเซลล์ของเชื้อโดยยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron transport) การเคลื่อนย้ายโปรตีน (protein translocation) ตลอดจนปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆ ทำให้เซลล์ตายเนื่องจากสาร terpenoids เป็นสารละลายได้ดีในไขมันดังนั้นจึงละลายได้ดีในส่วนผนังเซลล์ของเชื้อ (ฐานีย์, 2550)

2.9.2 กลไกการยับยั้งเชื้อราและยีสต์

น้ำมันหอมระเหยยังมีกิจกรรมยับยั้งกับ *Candida albicans* เช่นสารพวก citral, citronellol, geraniol และ geranyl acetate ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของน้ำมันยูคาลิปตัส, น้ำมันทีทรี และน้ำมันเจอเรเนียม (Zore และคณะ, 2011) ในทำนองเดียวกัน eugenol, thymol และ carvacrol มีผลกระทบต่อสถานะสมดุล Ca^{2+} และ H^+ ที่นำไปสู่การสูญเสียของไอออนและการยับยั้งของ *Saccharomyces cerevisiae* (Rao และคณะ, 2010) ความผิดปกติในการไหลของเมมเบรนส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของไซโทพลาสซึมและทำให้เกิดการเสียชีวิตของเชื้อราตัวอย่างเช่น การซึมผ่านเมมเบรนและกิจกรรมห่วงโซ่หายใจในเซลล์ของ *C. albicans* ถูกขัดขวางจึงทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Carson และคณะ, 2006; Hammer และคณะ, 2004) และการผ่านเมมเบรนของไมโทคอนเดรียได้นำไปสู่การเกิดเนื้อร้ายที่นำไปสู่การตายของเซลล์ (Armstrong, 2006) นอกจากนี้ ส่วนประกอบของแต่ละน้ำมันหอมระเหยยังไปรบกวน TOR signalling pathway ของยีสต์จึงส่งผลให้เกิดการสูญเสียความมีชีวิตสามารถสังเกต Modulation ของพลาสมาเมมเบรน ไซโทพลาสซึม และนิวเคลียสได้ด้วยการวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) ของเชื้อรา *Phytophthora infestans* (Soylu และคณะ, 2006)

2.10 ความหมายของอนุมูลอิสระ (Free radical)

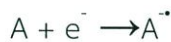
อนุมูลอิสระคืออะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่เข้าคู่อย่างน้อย 1 อิเล็กตรอนจึงเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร และว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี (ไมตรี และคณะ, 2545) อนุมูลอิสระอาจเกิดจากการสลายตัวของโมเลกุลที่ถูกกระตุ้นโดยรังสีเอ็กซ์ รังสีอัลตราไวโอเล็ต รังสีแกมมาและความร้อน หรืออาจเกิดจากกระบวนการย่อยสลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์เกิดจากการออกซิเดชันของลิพิดในอาหารเนื่องจากความร้อน แสง และโลหะหนัก เช่น เหล็กและแมงกานีส และเกิดจากมลภาวะ เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ ในสภาวะปกติร่างกายจะสร้างอนุมูลอิสระในอัตราที่ปกติ และเป็นไปในแนวทางที่เป็นประโยชน์ แต่ในสภาวะที่มีการสร้างมากเกินไป จะเกิดภาวะความเครียดเนื่องจากออกซิเดชัน (oxidative stress) จึงเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ พิษของอนุมูลอิสระต่อพืช เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดจะสร้างอนุมูลอิสระของ reactive oxygen species (ROS) ขึ้น (Polle และ Rennenberg, 1993)

การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกที่แตกต่างกันดังนี้

ก. การแตกของพันธะโควาเลนต์แบบโฮโมไลซิส (Homolysis)



ข. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



ค. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัวจากอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



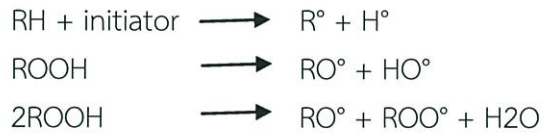
อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องต่างๆในทางชีววิทยาที่สามารถเป็นตัวตั้งต้นที่ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระได้อีกหลายชนิดสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species, RCS) สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้ 2 กลุ่มเช่นเปอร์ออกซีไนไตรท์ (Peroxynitrite) (โอภา และคณะ, 2550)

2.11 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นการเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องของอนุมูลอิสระซึ่งมีกลไกการเกิด 3 ขั้นตอนคือ Initiation, Propagation และ Termination (Shahidi และ Wanasundara, 1992)

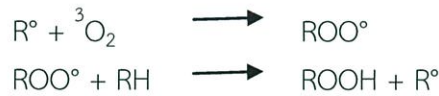
2.11.1 Initiation

โดยไฮโดรเจนที่จับกับคาร์บอนที่อยู่ถัดจากคาร์บอนอะตอมซึ่งพันธะคู่สลายไปเนื่องจากได้รับความร้อนหรือแสงสว่าง (Angelo, 1996) ออกซิเจนจะเข้าไปรวมกับไฮโดรคาร์บอนตรงพันธะคู่ได้เป็นอนุมูลเปอร์ออกซี (peroxy radical) อนุมูลเปอร์ออกซีเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งหรือตัวตั้งต้นของปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อไปโดยดึงไฮโดรเจนอะตอมจากโมเลกุลอื่นๆ ซึ่งจะทำให้เข้าสู่ปฏิกิริยาในขั้นต่อไป (Frankel, 1984)



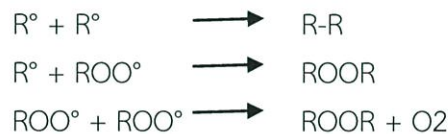
2.11.2 Propagation

เป็นปฏิกิริยาต่อเนื่องของอนุมูลอิสระโดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้เป็นอนุมูลเปอร์ออกซี (ROO°) ซึ่งสามารถดึงไฮโดรเจนจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวตัวอื่นเกิดเป็นสารไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (ROOH) ที่สามารถแตกตัวต่อเป็นอนุมูลอิสระได้อีกถ้ามีตัวเร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นและอนุมูลเปอร์ออกซีที่เกิดจากกรดไขมันที่ถูกดึงไฮโดรเจนทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจากนั้นจะทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัวตัวอื่นทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระได้อีกซึ่งจะเกิดเป็นลูกโซ่ปฏิกิริยาต่อเนื่องเรื่อยไป (Gordon, 2001)



2.11.3 Termination

เป็นระยะสุดท้ายของการเกิดปฏิกิริยาเมื่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวถูกออกซิไดซ์จนหมดอนุมูลอิสระที่เหลือจะเกิดการรวมกันเกิดเป็นสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนครบจึงมีความเสถียรไม่เกิดการเหนี่ยวนำปฏิกิริยาต่อไป (Gordon, 2001)



2.12 สารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant)

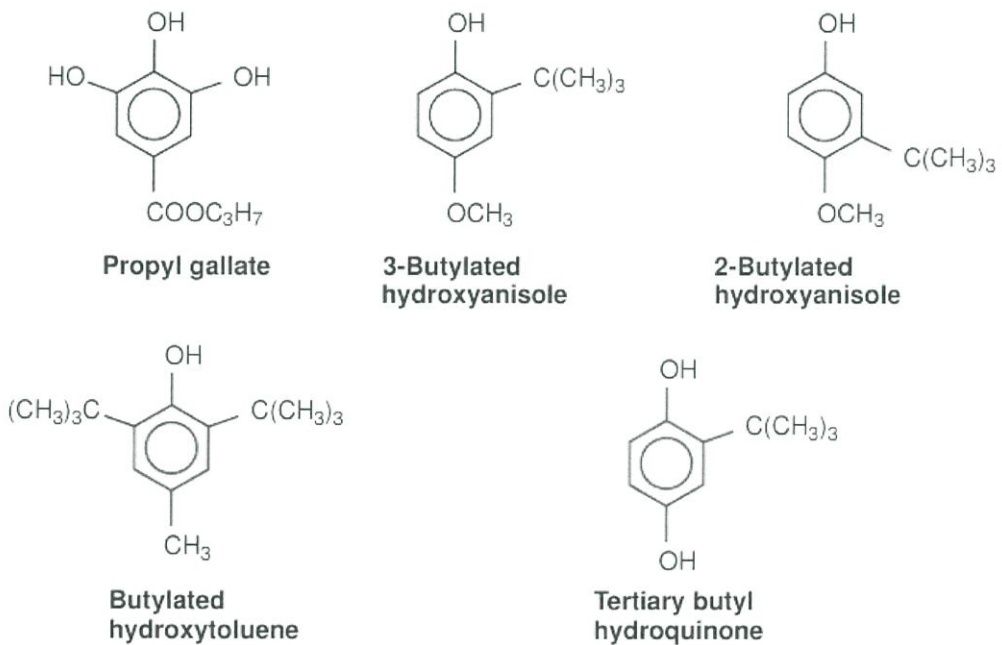
สารต้านออกซิเดชันสามารถช่วยรักษาคุณภาพของอาหารได้โดยการขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (Kinsella และคณะ, 1993; Noguchi และคณะ, 1994) USDA ได้ให้คำนิยามของสารต้านออกซิเดชันว่าเป็นสารที่ใช้สำหรับยืดอายุการเก็บรักษาของอาหารโดยชะลอการเสื่อมเสีย การเกิดกลิ่นหืนหรือการเปลี่ยนแปลงสีอื่นเป็นผลมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Shahidi และ Wanasundara, 1992)

2.13 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ได้มาจากพืชผักเครื่องเทศ ฝรั่ง และสมุนไพรได้รับความสนใจและศึกษากันอย่างกว้างขวางเนื่องจากกระแสเรื่องความปลอดภัยของสารสกัดจากธรรมชาติสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิด ได้แก่

2.13.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants)

สารประกอบฟีนอลิกสังเคราะห์ 5 ชนิดได้แก่ propyl gallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylated hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone ซึ่งสูตรโครงสร้างเคมีเป็นดังรูปที่ 2.11.1 เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันอันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่นสีและรสชาติที่เปลี่ยนไปสารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติแต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Pokorný และคณะ, 2001)



รูปที่ 2.13.1 โครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

(A) Propyl gallate, (B) 3- Butylated hydroxyanisole, (C) 2-Butylated hydroxyanisole, (D) Butylated hydroxytoluene, (E) Tertiary butyl hydroquinone

ที่มา: (Howell และ Saeed, 1999)

2.13.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants)

สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบันเนื่องจากความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้พบได้ทั้งในจุลินทรีย์และพืชซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามินเช่นวิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (non-nutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิกโดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เช่นแซนโทน (xanthone) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (aromatic hydroxyl) ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชัน (functional group) เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้โดยการให้อนุมูล H[•] แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น นอกจากนี้สารประกอบโพลีฟีนอลที่มีโครงสร้าง

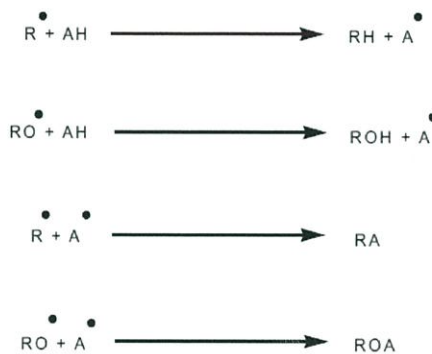
ของ ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล OH[•] ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชันคือ Fe²⁺ และ Cu²⁺ เป็นตัวเหนี่ยวนำได้โดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Sanchez-Moreno และคณะ, 2000) สารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอลซึ่งพบในพืชพรรณธรรมชาติมานานานชนิดสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีทั้งในห้องปฏิบัติการและในสิ่งมีชีวิต

2.14 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ

จากรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีหลายกลไกดังนี้

2.14.1 ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging)

การดักจับอนุมูลอิสระเป็นที่ทราบดีว่าสารต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้โดยการทำให้โมเลกุลของอนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้นซึ่งกลไกของปฏิกิริยาเกิดโดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ (Valacchi และคณะ, 2004) ดังสมการ



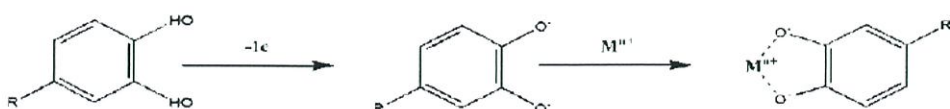
2.14.2 ยับยั้งการทำงานของซิงเกิ้ลทออกซิเจน (Singlet oxygen quenching, ¹O₂)

สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) สามารถยับยั้งการทำงานของซิงเกิ้ลทออกซิเจนโดยการเปลี่ยน (¹O₂) ให้อยู่ในรูปทริปเปอริท (triplet oxygen (³O₂)) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อนโดยที่แคโรทีนอยด์ (Car) จำนวน 1 โมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยากับซิงเกิ้ลทออกซิเจนได้ถึง 1,000 โมเลกุล (Sies และคณะ, 1992)



2.14.3 จับกับโลหะที่สามารถเร่งสารกลุ่มนี้ได้แก่ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (metal chelation)

โลหะที่มีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระคือ Fe²⁺ และ Cu²⁺ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ฟอสฟอริกแอซิด (phosphoric acid) และซิตริกแอซิด (citric acid) เป็นต้นสำหรับกลไกการจับโลหะของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Sanchez-Moreno และคณะ, 2000) แสดงดังสมการ



2.14.4 หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking)

วิตามินอี (α -tocopherol, Toc-OH) สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid autooxidation) โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron-acceptor antioxidants) จากอนุมูล peroxy ($\text{ROO}\cdot$) (Burton และ Traber, 1990)

2.14.5 เสริมฤทธิ์ (synergism)

สารชนิดนี้จะช่วยสนับสนุนให้สารต้านอนุมูลอิสระทำงานได้ดีขึ้น เช่น การทำงานร่วมกันระหว่างวิตามินอี (α -tocopherol) กับวิตามินซี (ascorbic acid) โดยที่วิตามินซีไม่สามารถทำงานในในสภาวะไม่มีขี้ (hydrophobic condition) ได้เหมือนกับวิตามินอีแต่จะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลแอลฟา-โทโคฟีรอลเปอร์ออกไซด์ (α -tocopherol peroxy) ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างแอลฟา-โทโคฟีรอลกับอนุมูลเปอร์ออกไซด์ ($\text{ROO}\cdot$) เพื่อเปลี่ยนรูปกลับไปเป็นแอลฟา-โทโคฟีรอลที่สามารถทำงานได้ (Frankel, 1998)

2.14.6 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition)

สารประกอบฟีนอลิกบางชนิดเช่นฟลาโวนอยด์กรดฟีนอลิก (phenolic acid) และแกลเลต (gallates) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซีจีเนส (lipoxygenase) โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้ (Puerta, 1999)

2.15 สารต้านอนุมูลอิสระกับการป้องกันโรค

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านอนุมูลอิสระได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากอนุมูลอิสระส่งผลเสียต่อร่างกายและเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคหลายชนิดในมนุษย์ เช่น โรคมะเร็ง ความดันโลหิตสูง เบาหวาน รูมาตอยด์ การศึกษาข้อมูลทางเภสัชวิทยาของสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีสารออกฤทธิ์หลายชนิดที่มีส่วนส่งเสริมสุขภาพและป้องกันการเกิดโรคในมนุษย์ (Cornish และ Garbary, 2010) ซึ่งตัวอย่างการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสารต้านอนุมูลอิสระแสดงดังตารางที่ 2.15

ตารางที่ 2.15 สารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Antioxidant compound	Perceived health benefit
β -Carotene, lutein	Antimutagenic Protective against breast cancer
Bromophenol	α -Glucosidase inhibition
Carrageenan, oligosaccharide	Anti-tumo
Fuoidan	Anti-HIV Ameliorates hyperoxaluria Anticancer Protection against neurodegenerative disorder

ตารางที่ 2.15 สารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ต่อ)

Antioxidant compound	Perceived health benefit
Fucophlorethols	Chemopreventive effects
Fucoxanthin	Antiangiogenic Protective effects against retinol deficiency
Galactan sulfate	Anti-viral
Phlorotannins	Anti-inflammatory Bactericide Inhibits H ₂ O ₂ mediated DNA damage Hypertension Photochemopreventive effects
Phycoerythrin	Amelioration of diabetic complications
Polyphenols	Vascular chemoprotection Antiproliferation Antimicrobial α -Glucosidase inhibition
Porphyran, shinorine	Delays aging process

ที่มา: Cornish และ Garbary (2010)

2.16 ตัวอย่างสารต้านออกซิเดชันบางชนิด

2.16.1 วิตามินซี

มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดีจึงทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์และอวัยวะที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิก (AsC_H2) มีหมู่ไฮดรอกซี 2 หมู่ที่แตกตัวให้ไฮโดรเจนได้ปฏิกิริยาโดยรวมคือการให้อิเล็กตรอน 1 ตัวร่วมกับอะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระเป็นการกำจัดหรือสลายอนุมูลอิสระคือ R[•] ให้เป็น RH จากการกำจัดนี้จะได้อนุมูลอิสระตัวใหม่ที่มีความไวต่ำคือ Asc^{•-} (ปริยานุช, 2551)

2.16.2 วิตามินอี

หรือ tocopherol เป็นวิตามินที่ละลายได้ดีในไขมันจากโครงสร้างมีได้หลายไอโซเมอร์หรือรูปแบบ α -tocopherol เป็นไอโซเมอร์ที่มีฤทธิ์สูงสุดจากบรรดาไอโซเมอร์ทั้งแปด วิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลที่สำคัญของเมมเบรนซึ่งมีลิพิดเป็นองค์ประกอบโดยปกป้องไม่ให้เกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (ปริยานุช, 2551)

2.16.3 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกจัดเป็นสารต้านอนุมูลที่ได้รับจากภายนอกและพบได้มากในธรรมชาติ ได้แก่พืชผักผลไม้ชาเขียวชาดำช็อกโกแลตและไวน์แดง เป็นต้น ในปัจจุบันพบสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8,000 ชนิดในธรรมชาติตั้งแต่โมเลกุลอย่างง่ายเช่นกรดฟีนอลิกฟีนิลโปรพานอยด์และฟลาโวน

น้อยต่อไปจนถึงโครงสร้างโพลีเมอร์ที่ซับซ้อนเช่นลิกนินเมลานินและแทนนินเป็นต้นแม้ว่าปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในธรรมชาติจะมีปริมาณที่แตกต่างกันแต่พบว่าปริมาณโดยเฉลี่ยที่คนได้รับต่อวันจะอยู่ในช่วงตั้งแต่ 20 มิลลิกรัม ถึง 1 กรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าปริมาณวิตามินอีที่ได้รับต่อวันสารโพลีฟีนอลิกเป็นสารที่พบทางสำคัญเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต้านไวรัสต้านการอักเสบต้านการแพ้และมีคุณสมบัติในการสลายลิ่มเลือดรวมเป็นสารต้านการก่อมะเร็งและสามารถลดความดันโลหิตในการสลายลิ่มเลือดเหล่านี้เป็นต้นซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนี้มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูล โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวงอะโรมาติกและมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซีอย่างน้อย 1 หมู่ในที่นี้กล่าวถึงสารกลุ่มที่สำคัญได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (ปรียานูช, 2551)

สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่มตามความแตกต่างของสูตรโครงสร้างโดยเฉพาะที่วงที่มีอะตอมออกซิเจนอยู่ในรูปแบบต่างๆเช่นไอเทอร์คีโตนรวมทั้งการมีหมู่ไฮดรอกซีแทนที่บนวงอะโรมาติกในโมเลกุลตัวอย่างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ได้แก่ฟลาแวน (flavones) ฟลาวาโนน (flavanols) ฟลาวานอล (flavanols) ฟลาโวนอล (flavonols) ฟลาโวน (flavones) และแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) โครงสร้างของฟลาโวนอยด์บางชนิด (ปรียานูช, 2551)

2.16.4 บีเอชเอ (BHA)

เป็นวัตถุกันหืนที่นิยมใช้กันมากชนิดหนึ่งโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีไขมันและน้ำมันเป็นส่วนประกอบบีเอชเอเป็นสารประกอบที่มีผลึกสีขาวหรือสีเหลืองอ่อนมีกลิ่นฉุนไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในแอลกอฮอล์ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของสารผสม 2- และ 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole หรืออาจใช้ร่วมกับกลีเซอรอลหรือบีเอชทีเพื่อให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น (ปรียานูช, 2551)

2.16.5 บีเอชที (BHT)

เป็นวัตถุกันหืนชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันเช่นเดียวกับบีเอชเอแต่มีประสิทธิภาพดีกว่าเล็กน้อย บีเอชทีเป็นสารประกอบที่เป็นผลึกสีขาวหรือสีเหลืองอ่อนไม่ละลายน้ำและ propane-1,2-diol แต่ละลายในแอลกอฮอล์และให้กลิ่นฟีนอล (phenol) เช่นเดียวกันมักนิยมให้ผสมกับวัตถุกันหืนชนิดอื่นเพื่อเสริมให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นนิยมใช้ในอาหารประเภทไขมันสัตว์น้ำมันพืชผลิตภัณฑ์นมผลิตภัณฑ์ขนมอบผลิตภัณฑ์เนื้อผลิตภัณฑ์ปลาและน้ำมันหอมระเหย (ปรียานูช, 2551)

2.16.6 สารคีเลทโลหะ (metal chelator)

การจัดโลหะทรานซิชันโดยใช้สารคีเลทโลหะเป็นอีกกลไกหนึ่งที่ใช้ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุลทั้งนี้เพราะโลหะทรานซิชัน เช่น ธาตุเหล็กและทองแดงมีส่วนสำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระสารคีเลทโลหะในร่างกายส่วนใหญ่เป็นโปรตีนทำหน้าที่จับโลหะทรานซิชันที่ก่อให้เกิด OH เข้ามารวมไว้ในโครงสร้างโดยอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนโลหะจึงไม่สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระได้โปรตีนในร่างกายที่จับโลหะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนมีดังนี้คือทรานเฟอร์ริน (transferrin) เฟอร์ริติน (ferritin) แล็กโตเฟอร์ริน (lactoferrin) เซรูโลพลาสมิน (ceruloplasmin) ฮีโมเพล็กซิน (hemopexin) แฮปโทโกลบิน (haptoglobin) และอัลบูมินนอกจากนี้สารฟลาโวนอยด์ยังทำหน้าที่เป็นสารคีเลทโลหะด้วย (ปรียานูช, 2551)

2.17 การสกัดและการตรวจสอบฤทธิ์ของสารในอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบฟีนอลิก สารกลุ่มนี้มีหลากหลายชนิด ตัวอย่างเช่น tocopherol, tocotrienol, γ -oryzanol, oryzanols (Lai และคณะ, 2007), caffeic acid, syringic acid, rutin, (-)-epicatechin, (+)-catechin, gallic acid, vanilic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid และ quercetin (Que และคณะ, 2007) รวมทั้งสารจำพวกฟลาโวนอยด์ (Vichitphan และคณะ, 2007; Ramamoorthy และ Bono, 2007) โดยทั่วไปการสกัดสารประกอบฟีนอลิกมักใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งมีความแตกต่างกันตามแต่ลักษณะและองค์ประกอบของสาร ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้สำหรับสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้แก่ น้ำ เมธานอล เอทานอล เอธิลอะซิเตต (Ramamoorthy และ Bono, 2007) และตัวทำละลายที่มีขี้ดต่ำ เช่น เฮกเซน (C_6H_{14}) อะซีโตน (C_3H_6O) คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) ปีโตรเลียมอีเทอร์ หรือคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระมักประกอบด้วยสารหลายชนิดที่ทำงานเสริมกัน จึงจะมีประสิทธิภาพสูงในการทำงาน ปัจจุบันพบว่าพืชผักและผลไม้ที่มีสี เช่น สีแดง สีส้ม หรือสีม่วง จะมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง (Zhang และคณะ, 2006) วิธีการที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี แต่ละวิธีมีความจำเพาะต่อสารแตกต่างกัน โดยปกติแล้วการตรวจสอบมักจะสรุปผลจากหลายวิธีร่วมกัน เพื่อให้ผลการทดสอบมีความถูกต้องยิ่งขึ้น วิธีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่นิยม ได้แก่

2.17.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอซ (diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay)

DPPH เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระในทันทีคือ อนุมูลอิสระดีพีพีเอซ (DPPH \cdot , diphenyl-picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อ DPPH \cdot ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลงๆ จนเป็นสีเหลือง ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มีดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH \cdot สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น (ก่อนใส่สารตัวอย่าง) ดังนี้



โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ โทรล็อกซ์ (trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid) แสดงค่าเป็น TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) มีหน่วยเป็น mM/mg หรือ mM/mg ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ส่วนข้อเสีย คือ DPPH \cdot ก่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย

จริงจึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ซ้ำทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ อีกทั้งสารปนเปื้อนและโลหะจะรบกวน (interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรบกวนแล้วทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH จางลงเช่นกัน (Mensor และคณะ, 2001)

2.17.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay)

วิธีการนี้อาศัยหลักการของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ ซึ่ง $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ปริมาณของ $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO_4) ซึ่งขั้นตอนโดยละเอียดของวิธีการนี้ได้แก่ การทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ ประกอบด้วย นำสารละลาย TPTZ (2,4,6-tri (2-pyridyl)-striaizine) ที่ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจางมาทำปฏิกิริยากับสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ และสารละลายเฟอร์ริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต จากนั้นทำการรีดิวซ์เฟอร์ริกโดยการเติมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟตหรือสารตัวอย่าง (สารต้านอนุมูลอิสระ) และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง และสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิม แต่ข้อเสีย คือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยา เคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกาย และสารละลายที่ใช้อ้างอิงต้องใช้น้ำ ปราศจากไอออน (deionizedwater) (Benzie และ Strain, 1996)



2.17.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay)

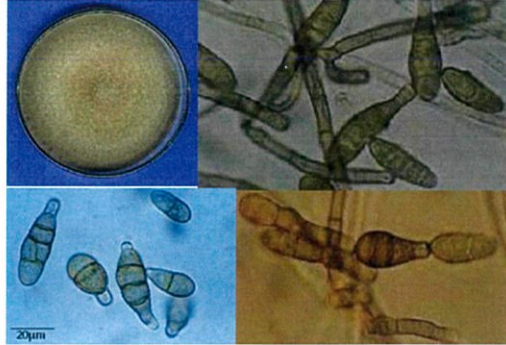
ABTS เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ($\text{ABTS}^{\cdot+}$, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาว คลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลงและตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐาน trolox กระทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH ข้อดีของวิธีการนี้ คือ $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำ ละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง (Re และคณะ, 1999) ส่วนข้อเสีย คือ $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ (Lo และ Cheung, 2005)



2.18 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

2.18.1 เชื้อรา

2.18.1.1 *Alternaria alternata*

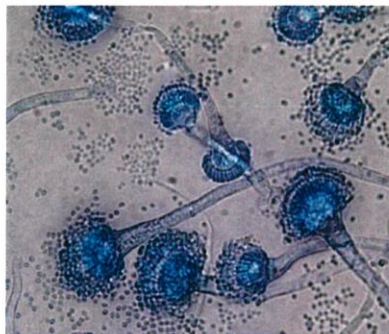


รูปที่ 2.18.1.1 *Alternaria alternata*

ที่มา: <http://app1.bedo.or.th/FungiSS/db/view.asp?id=5-0010> (8 พฤศจิกายน 2557)

Alternaria alternata โคลนีนบนอาหาร PDA เจริญค่อนข้างเร็ว เส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส สีเทาจนถึงสีดำ ลักษณะฟู ไม่เปลี่ยนสีอาหาร conidiophore เกิดเดี่ยวๆ หักงอแบบ geniculate สีน้ำตาลทอง ผนังเรียบ ขนาด 2.5-5x55 ไมโครเมตร เป็นสาเหตุโรคใบจุดของพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด มีรายงานใช้ควบคุมวัชพืชที่สำคัญเช่น ผักปอดนา ผักขม ผักตบชวา และจอก (วราวุฒิ, 2538)

2.18.1.2 *Aspergillus flavus*



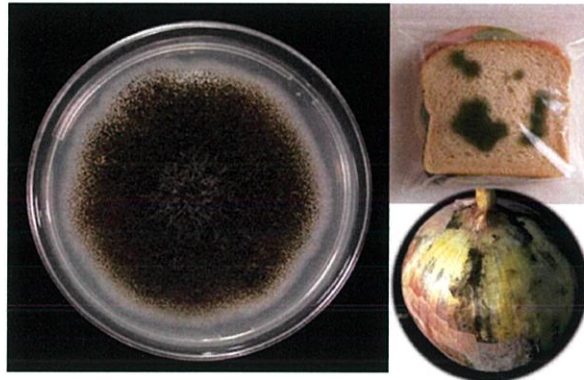
รูปที่ 2.18.1.2 *Aspergillus flavus*

ที่มา: <http://lifescience-corner.blogspot.com> (8 พฤศจิกายน 2557)

Aspergillus flavus เป็นเชื้อราชนิดหนึ่ง อยู่ในวงศ์ Aspergillus เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย (microbial spoilage) และผลิตสารพิษไมโคทอกซิน มีชื่อว่า อะฟลาทอกซิน ที่เป็นอันตรายเป็นสาเหตุของโรคมะเร็งตับ

ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *Aspergillus flavus* มี conidium รูปร่างกลม ไม่มีสี ผนังขรุขระ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2.5-5 ไมครอน เกิดบนปลาย sterigma ที่สร้างบน vesicle มีรูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 25-45 ไมครอน conidiophore ไม่มีสี ผนังหนา ผนังขรุขระ มีความยาวอยู่ในช่วง 480-800 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลาง 10-15 ไมครอน (วรารุฒิ, 2538)

2.18.1.3 *Aspergillus niger*



รูปที่ 2.18.1.3 *Aspergillus niger*

ที่มา: <http://kamil-habbatussauda.blogspot.com> (8 พฤศจิกายน 2557)

Aspergillus niger เรียกอีกอย่างว่า ราดำ ซึ่งมีลักษณะสีของ conidial head เป็นสีดำหรือสีน้ำตาลดำ vesicle ค่อนข้างกลม สามารถเจริญและสร้างสปอร์ได้ดีบนอาหาร Czapek's Dox Agar การจัดเรียงตัวของ sterigmata เป็นแบบ biserial มักพบบนผลไม้และผักบางชนิด เช่น องุ่น หัวหอม และถั่วลิสง เป็นสารปนเปื้อนที่พบบ่อยในอาหาร รวมทั้งฝาผนังที่มีความชื้น บางสายพันธุ์ของ *A. niger* ทำให้เกิดสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxins) ที่เรียกว่า "ochratoxins" ซึ่งอาจเป็นสารที่ก่อมะเร็ง (วรารุฒิ, 2538)

2.18.1.4 *Aspergillus ochraceus*



รูปที่ 2.18.1.4 *Aspergillus ochraceus*

ที่มา: <http://show.wnmu.edu/microfungi> (8 พฤศจิกายน 2557)

Aspergillus ochraceus เกิดความเป็นพิษต่อไตทำให้เกิดการอักเสบ มีพิษต่อดับ ทำให้ตัวอ่อนพิการ *A. ochraceus* ผลิตสารพิษ ochartoxin พบมากในผลิตภัณฑ์ ข้าวโพด ถั่วเมล็ดแห้ง เมล็ดโกโก้ ถั่วเหลือง ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เลย์ บาร์ซิลินท์ ยาสูบที่ขึ้นรา ถั่วลิสง และเมล็ดกาแฟ (วรารุณี, 2538)

2.18.1.5 *Aspergillus parasiticus*

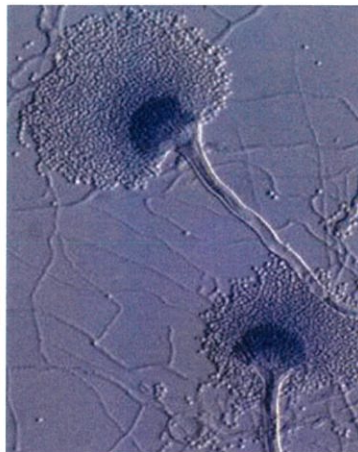


รูปที่ 2.18.1.5 *Aspergillus parasiticus*

ที่มา: <http://fungi.myspecies.info/all-fungi/aspergillus-parasiticus> (8 พฤศจิกายน 2557)

Aspergillus parasiticus สามารถเจริญเติบโตและสร้างสารพิษได้ดี แหล่งอาหารเลี้ยงเชื้ออุดมสมบูรณ์ ได้แก่เมล็ดพืชหรือวัสดุทางการเกษตรกรรม อาหารคนและอาหารสัตว์ที่มีความชื้นสร้าง aflatoxin (วรารุณี, 2538)

2.18.1.6 *Aspergillus terreus*



รูปที่ 2.18.1.6 *Aspergillus terreus*

ที่มา: <http://www.aspergillus.org.uk> (8 พฤศจิกายน 2557)

Aspergillus terreus conidial head มีสีน้ำตาลอมเหลือง สามารถเจริญและสร้างสปอร์ได้ดีบนอาหาร Czapek's Dox Agar vesicle ค่อนข้างกลม การจัดเรียงตัวของ sterigmata เป็นแบบ biseriate (วารวูฒิ, 2538)

2.18.1.7 *Aspergillus versicolor*

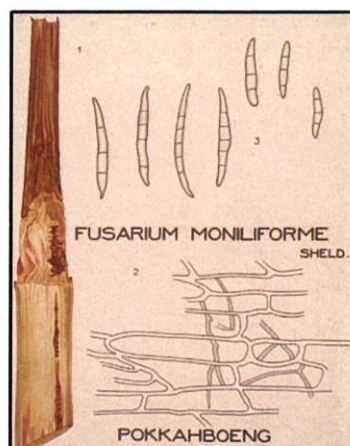


รูปที่ 2.18.1.7 *Aspergillus versicolor*

ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/Aspergillus_versicolor (8 พฤศจิกายน 2557)

Aspergillus versicolor สร้างสารพิษ sterigmatocistine เป็นสารก่อมะเร็งที่ทำให้เกิดมะเร็งตับ และมีความรุนแรงประมาณ 1/10 เท่าของ aflatoxin โดยทั่วไปโคโคไคโนจะมีสีขาวในช่วงเริ่มต้นของการเจริญ และเปลี่ยนเป็นสีเหลือง สีส้ม และสีเขียว มักพบเชื้อนี้ในเมล็ดกาแฟสด ข้าวสาลีที่ขึ้นรา ข้าวโอ๊ต และผิวหนังนอกของเนยแข็งบางชนิด เช่น dutch cheese (วารวูฒิ, 2538)

2.18.1.8 *Fusarium moniliforme*



รูปที่ 2.18.1.8 *Fusarium moniliforme*

ที่มา: <http://www.geheugenvannederland.nl> (8 พฤศจิกายน 2557)

Fusarium moniliforme สร้างสารพิษ fumonisins เชื้อรานี้ส่วนมากพบใน ข้าวโพด ข้าว และข้าวฟ่าง สารพิษ Fumonisin ถูกพบว่าเป็นสารก่อมะเร็งเช่นกัน ที่พบมากคือทำให้เกิดโรค Equeie Leukoencephalomalacia (ELEM) กับม้า ทำให้ม้าเสียชีวิตและตายเนื่องจากสมองถูกทำลาย ทำให้เกิดโรค Porcine pulmonary edema (PPE) กับหมู และโรค Human esophageal cancer กับคนในประเทศแอฟริกาใต้ และประเทศจีน อีกทั้งเป็นสาเหตุของโรคลำต้นเน่า (วรารุณี, 2538)

2.18.1.9 *Geotrichum candidum*



รูปที่ 2.18.1.9 *Geotrichum candidum*

ที่มา: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com> (8 พฤศจิกายน 2557)

Geotrichum candidum ทำให้เกิดโรคพืช sour rot, oospora rot หรือ water soft Rot ในมะเขือเทศ ซึ่งแพร่กระจายจากดิน และซากพืชที่เน่าเปื่อย โดยมีแมลงหวี่ประเภท fruit fly เป็นพาหะนำสปอร์ และส่วนเส้นใยของเชื้อราแพร่กระจายไปยังผักสด ลักษณะการเน่าเสีย คือน้ำเยิ้ม อาจมีการเจริญของราเป็นฝ้าสีขาวอยู่ที่บริเวณรอยแตก มักเกิดบริเวณก้านดอกหรือบริเวณที่มีบาดแผล (วรารุณี, 2538)

2.18.1.10 *Penicillium citrinum*

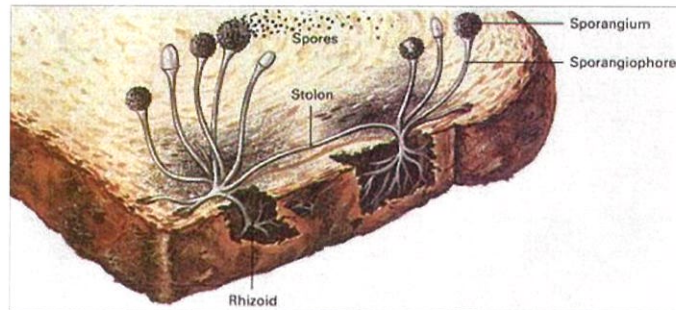


รูปที่ 2.18.1.10 *Penicillium citrinum*

ที่มา: <http://imgarcade.com/1/penicillium-citrinum> (8 พฤศจิกายน 2557)

Penicillium citrinum สามารถสร้างซีตรินิน เนื่องจากเชื้อราสายพันธุ์นี้สามารถสร้างสารพิษชื่อ Ochratoxin A, OTA) พบทั่วไปในธัญพืช เช่น ข้าวสาลี และข้าวบาร์เลย์ โดยทั่วไปจะพบทั้ง Ochratoxin A และซีตรินินพร้อมกัน แต่มีการศึกษาเกี่ยวกับซีตรินินน้อยกว่า อาจเป็นเพราะไม่สามารถตรวจพบซีตรินินได้ง่าย (วรารุณี, 2538)

2.18.1.11 *Rhizopus stolonifera*

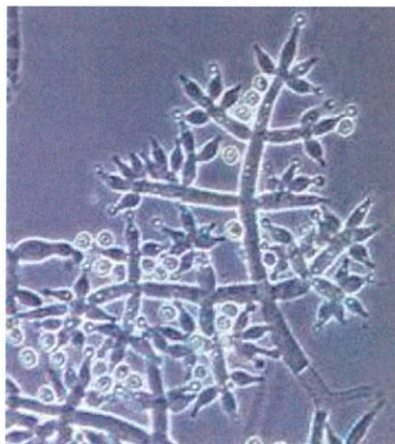


รูปที่ 2.18.1.11 *Rhizopus stolonifera*

ที่มา: <http://www.foodnetworksolution.com> (8 พฤศจิกายน 2557)

Rhizopus stolonifera หรือ bread mold คือ เชื้อราในจีนัสไรโซปัสที่สำคัญต่ออาหารเป็นสาเหตุทำให้อาหารเสื่อมเสีย ค่า water activity ต่ำสุดที่เจริญได้คือ 0.93 *Rhizopus stolonifera* เป็นราแบบเส้นใยไม่มีผนังกัน (non septate hypha) มักสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศคือ สปอร์แรงจิโอสปอร์ (sporangiospore) ซึ่งรวมกันอยู่ใน sporangium ที่มีรูปร่างกลม ที่ฐานของ sporangiphore ซึ่งเป็นก้านชูสปอร์ มีไรซอยด์ (rhizoid) และสโตลอน (stolon) ซึ่งเป็นเส้นใยที่เชื่อม sporangiospore (วรารุณี, 2538)

2.18.1.12 *Trichoderma harzianum*



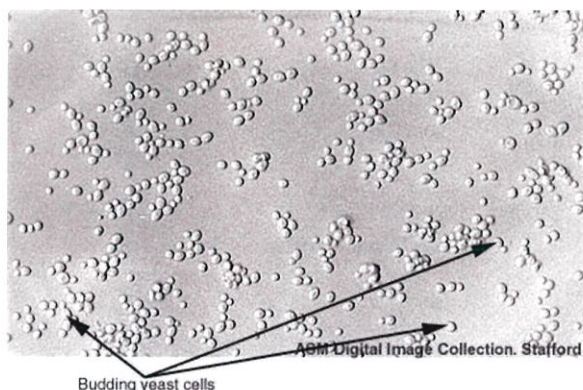
รูปที่ 2.18.1.12 *Trichoderma harzianum*

ที่มา: <http://www.thaifungus.com/product/detail-192436.html> (8 พฤศจิกายน 2557)

Trichoderma harzianum เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นศัตรูต่อเชื้อราโรคพืชหลายชนิด มีสีเขียว เจริญเติบโตได้ดีในดิน บนเศษซากพืช ซากสิ่งมีชีวิต และซากอินทรีย์วัตถุตามธรรมชาติ ชอบสภาพดินที่ชื้นแต่ไม่แฉะ สามารถเป็นปรสิต โดยการพันรัดเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชแล้วสร้างเอนไซม์ เช่น โคติเนส, β -1,3 glucanase และ cellulase ย่อยสลายผนังเส้นใยของเชื้อโรคพืช จากนั้นจึงแทงเส้นใยเข้าไปเจริญอยู่ภายในเส้นใยโรคพืช ทำให้สูญเสียความมีชีวิตลง นอกจากนี้ยังมีความสามารถสูงในการแข่งขันกับเชื้อโรคพืชด้านการใช้อาหาร เจริญเติบโตสร้างเส้นใยและสปอร์ได้อย่างรวดเร็ว บางสายพันธุ์สามารถสร้างปฏิชีวนะสาร เพื่อยับยั้งหรือทำลายเส้นใยของเชื้อโรคจนเกิดการเหี่ยวสลายและตายได้ (วรารุณี, 2538)

2.18.2 เชื้อยีสต์

2.18.2.1 *Candida albicans*



รูปที่ 2.18.2.1 *Candida albicans*

ที่มา: <http://genesishealthproducts.com/th/parasites/what-is-candida> (9 พฤศจิกายน 2557)

Candida albicans เมื่อย้อมสีแกรมจะติดสีน้ำเงินปรากฏให้เห็นสองรูปแบบคือยีสต์และสายร่ายาว สามารถเจริญได้ที่ทั้งบนพื้นผิวและในสารคัดหลั่งของร่างกายมักพบในช่องปาก ระบบทางเดินหายใจ ลำไส้และช่องคลอด เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็นรูปแบบยีสต์ที่มีการแตกหน่อจำนวนมากขณะที่เจริญแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อจะมีการเปลี่ยนรูปร่างเป็นเส้นใยที่มีและไม่มีผนังกัน (วรารุณี, 2538)

2.18.2.2 *Candida lipolytica*

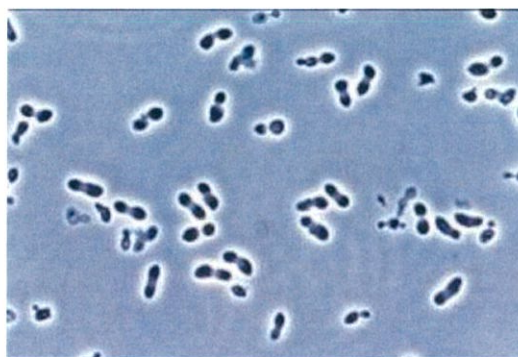


รูปที่ 2.18.2.2 *Candida lipolytica*

ที่มา: <http://www.doctorfungus.org/aboutdrf/legal> (9 พฤศจิกายน 2557)

Candida lipolytica อยู่ในสกุล *Candida* เซลล์มีรูปร่างกลม รูปไข่ รูปทรงกระบอก สืบพันธุ์ด้วยการแตกหนอแบบ multipolar budding สามารถสร้างชูโตไมซีเลียม (pseudomycelium) ซึ่งจะมีการสร้างบลาสโทสปอร์ (blastospores) ซึ่งเป็นสปอร์ที่เกิดจากการแบ่งตัวของชูโตไมซีเลียมและยังมีการสร้างคลาโมโดสปอร์เรส (chlamydospores) ไม่มีการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospores) ไม่มีเมดูลีแคโรทีนอยด์จึงทำให้เห็นการสร้างสีของเซลล์ได้ (วรารุณี, 2538)

2.18.2.3 *Debaryomyces hansenii*

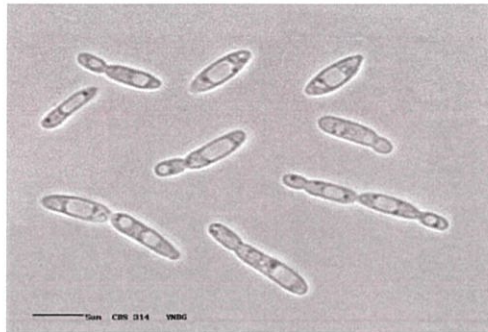


รูปที่ 2.18.2.3 *Debaryomyces hansenii*

ที่มา: <http://evodisku.multiply.com/journal/item/82/GIST> (9 พฤศจิกายน 2557)

Debaryomyces hansenii เซลล์มีหลายรูปร่าง สืบพันธุ์โดยการสร้างแอสโคสปอร์บางครั้งเพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อรอบเซลล์หรืออาจแตกหน่อแบบเรียงตัวต่อกัน พบว่าหน่อจะไม่หลุดออกจากกันจนคล้ายกับเส้นใยเรียกว่าเส้นใยเทียมหรือซูโดไมซีเลียม แหล่งที่พบเชื้อนี้คืออาหารที่มีเกลือเข้มข้น 24 เปอร์เซ็นต์และมี Aw ต่ำกว่า 0.65 เช่น ซีอิ๊ว หรืออาจพบเชื้อนี้ในน้ำส้มและโยเกิร์ต (บุษกร, 2552)

2.18.2.4 *Hanseniaspora uvarum*

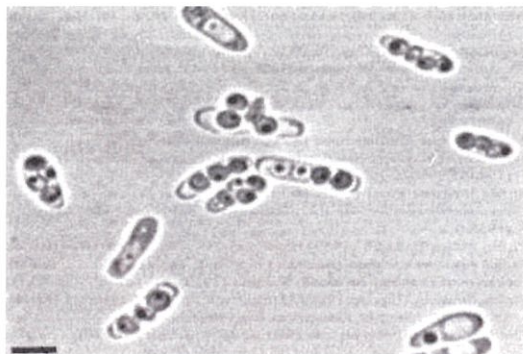


รูปที่ 2.18.2.4 *Hanseniaspora uvarum*

ที่มา: <http://terroirists.files.wordpress.com/2010/09/hansen.jpg> (9 พฤศจิกายน 2557)

Hanseniaspora uvarum เซลล์มีรูปร่างกลม ทรงแบนคล้ายไข่ ทรงกระบอก หรือทรงยาว สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อซึ่งจะเกิดขึ้นตรงฐานลักษณะแคบๆ ตรงส่วนใดของเซลล์ก็ได้ มีการสร้างสปอร์รูปหมวก จำนวน 2-4 สปอร์หรือสามารถเพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อรอบเซลล์หน่อที่แตกออกมาอาจเรียงตัวต่อกันเป็นสายยาวคล้ายเส้นใยเทียม (บุษกร, 2552)

2.18.2.5 *Pichia membranaefaciens*

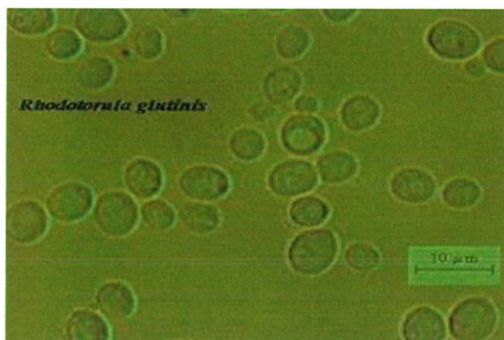


รูปที่ 2.18.2.5 *Pichia membranaefaciens*

ที่มา: <http://genome.jgi-psf.org/Picme1/Picme1.home.html> (9 พฤศจิกายน 2557)

Pichia membranaefaciens มีการสืบพันธุ์ 2 แบบ คือแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ และแบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ รูปหมวก บทบาทในอาหารคือทำให้เกิดฝ้าบริเวณผิวอาหารหมัก (บุษกร, 2552) เป็นยีสต์ที่ก่อให้เกิดปัญหาในการผลิตเบียร์และไวน์ เพราะจะสร้างฝ้า (pellicle) ชั้นที่ผิวของน้ำหมัก ยีสต์สายพันธุ์นี้สามารถใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ และยังสามารถเจริญได้ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นต่ำ 10 เปอร์เซ็นต์ (วรารุณี, 2538)

2.18.2.6 *Rhodotorula glutinis*



รูปที่ 2.18.2.6 *Rhodotorula glutinis*

ที่มา: <http://www.google.co.th/imgres?um=1&hl> (9 พฤศจิกายน 2557)

Rhodotorula glutinis เซลล์มีรูปร่างกลม รูปไข่หรือทรงยาว สืบพันธุ์โดย multilateral budding ไม่มีการสร้างแอสโคสปอร์ มีการสร้างสีแดงหรือเหลืองจากเม็ดสีแคโรทีนอยด์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมอลต์ (malt agar) โดยเชื้อ *R. glutinis* นี้ใช้ในการผลิตไขมัน (วรารุณี, 2538) บทบาทของเชื้อนี้ในอาหาร คือทำให้อาหารมีสีชมพูหรือสีแดงเติบโตบนผิวหน้าอาหารหมัก ปลา เนื้อ หมู กุ้งและเนื้อ (บุษกร, 2552)

2.18.2.7 *Schizosaccharomyces pombe*

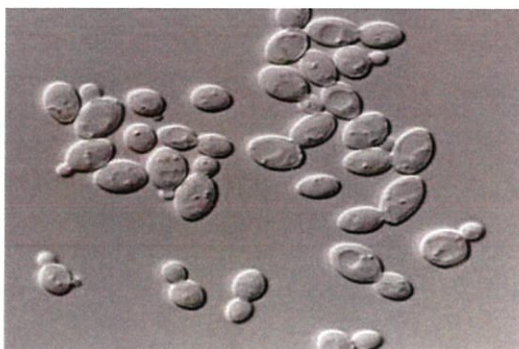


รูปที่ 2.18.2.7 *Schizosaccharomyces pombe*

ที่มา: http://www.cdb.riken.go.jp/jp/04_news/annual_reports/2003/WebHelp/Yeast.htm (9 พฤศจิกายน 2557)

Schizosaccharomyces pombe มีรูปร่างกลมจนถึงทรงกระบอก แตกต่างจากยีสต์ชนิดอื่นตรงที่ไม่มีการแตกหน่อแต่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ชอบเติบโตในที่มีน้ำตาลเข้มข้นสูง จึงทำให้น้ำผึ้ง ผลไม้แห้ง ลูกเกดเน่าเสีย ยีสต์สายพันธุ์นี้ถูกแยกออกมาได้จากน้ำตาล และกากน้ำตาลที่ทำมาจากอ้อย ยีสต์สายพันธุ์นี้ใช้ในการผลิตอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ (วารวุฒิ, 2538)

2.18.2.8 *Zygosaccharomyces rouxii*



รูปที่ 2.11.2.8 *Zygosaccharomyces rouxii*

ที่มา: <http://www.ncyc.co.uk/print-photo-ncyc-CBS710.html> (9 พ.ย. 2557)

Zygosaccharomyces rouxii มีการสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อหลายขั้ว เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการหมักน้ำตาล บางชนิดของเชื้อสกุลนี้สามารถเติบโตได้ที่ Aw เท่ากับ 0.62 และมีค่าพีเอชเท่ากับ 1.8 (บุษกร, 2552)

2.19 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความเข้มข้นและโครงสร้างทางเคมีของผลผลิตน้ำมันหอมระเหยบริสุทธิ์นอกจากมีกลิ่นหอมแล้วยังมีกิจกรรมต้านจุลินทรีย์ การศึกษาแสดงให้เห็นว่าผลผลิตน้ำมันหอมระเหยบริสุทธิ์มีกิจกรรมการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีมากกว่าองค์ประกอบหลักที่แยกการทดสอบ (Burt, 2004) น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อโรคหลังการเก็บเกี่ยวได้เนื่องจากมีผลโดยตรงต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อโรค และการงอกของสปอร์โดยมีผลกระทบต่อเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ของเชื้อโรค (Serrano และคณะ, 2005; Tzortzakis, 2007; Regnier และคณะ, 2010) น้ำมันหอมระเหยจะไม่ละลายในน้ำเนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นน้ำมันไม่ชอบน้ำดังนั้นส่วนของน้ำมันจะแทรกเข้าไปในชั้นไขมันที่เป็นเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อราและส่งผลให้เกิดการหยุดชะงักการสร้างโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์อย่างสมบูรณ์ การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ทำให้ H^+ และ K^+ cation มีการซึมผ่านที่เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นเหตุนี้อาจทำให้เกิดการ

เปลี่ยนแปลงการไหลของโปรตอนเกิด ion gradients และพีเอชภายในเซลล์เปลี่ยนไป องค์ประกอบทางเคมีที่มีผลต่อเซลล์และกระบวนการของเมทาบอลิซึมในเซลล์ของเชื้อโรคสุดท้ายก็ส่งผลให้เซลล์ตาย (Beckman, 2000) ปฏิสัมพันธ์เหล่านี้ของน้ำมันหอมระเหยกับเยื่อหุ้มเซลล์อาจทำให้เกิดการรั่วไหลของส่วนประกอบภายในเซลล์ของเชื้อโรค เช่น ATP ซึ่งเป็นโมเลกุลหลักในการจัดเก็บพลังงาน สารประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย เช่น carvacrol, eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol) และ thymol พบว่าสารประกอบฟีนอลเป็นโครงสร้างทางเคมีที่พบมากที่สุดในน้ำมันหอมระเหยซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ที่แข็งแกร่งต่อเชื้อราที่ก่อโรค (Lambert และคณะ, 2001) โดยฟีนอลยังมีผลกระทบต่อโปรตีนซึ่งอาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติในโครงสร้างเมมเบรนและฟังก์ชัน (Fung และคณะ, 1977) ตามที่ Lambert และคณะ (2001) และ Bagamboula และคณะ (2004) บอกไว้ว่าน้ำมันหอมระเหยมีเปอร์เซ็นต์ของสารประกอบฟีนอลสูง (กลุ่มไฮดรอกซิลในวงเบนซีน) เช่น carvacrol, eugenol และ thymol มีคุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านอนุมูลอิสระที่สูง ได้มีการสันนิษฐานว่าหากการทำงานของน้ำมันหอมระเหยโดยไม่มีสารประกอบกลุ่มฟีนอลอาจทำให้เกิดการหยุดชะงักการสร้างเมมเบรนโดยสารประกอบที่ละลายในไขมัน (Mendoza และคณะ, 1997) มีรายงานว่ามีการนำสารประกอบพวก geranial, neral, thymol, terpinen-4-ol, linalool และ carvacrol จากน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดมาใช้กันมาก (Amvam และคณะ, 1998) การเสริมฤทธิ์ระหว่างน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดสามารถใช้ประโยชน์เพื่อปรับปรุงกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์และยังเป็นการลดความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยซึ่งทำให้มีผลในการต้านจุลินทรีย์ที่สูงขึ้นโดยไม่ส่งผลกระทบต่อรสชาติของผลไม้ (Nguetack และคณะ, 2012) อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษจากเชื้อราเป็นสารก่อมะเร็งที่เป็นอันตรายซึ่งผลิตโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ที่พบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในถั่วและธัญพืชเป็นปัญหาที่พบบ่อยมากในประเทศกำลังพัฒนาโดยก่อให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างรุนแรง (Williams และคณะ, 2004) น้ำมันหอมระเหยกานพลูและอบเชยน้ำมันมีรายงานการแสดงให้เห็นถึงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของการผลิตอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* (Sinha และคณะ, 1993)

2.19.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหย

Manso และคณะ (2013) ได้ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยอบเชยที่ได้จากเปลือกไม้ที่มีผลต่อเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในบรรจุภัณฑ์อาหาร พบว่าปริมาณเซลล์เชื้อราที่ 10^3 , 10^4 , 10^5 และ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร มีค่า MIC เท่ากับ 0.05-0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Unlu และคณะ (2010) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยอบเชยที่ได้จากเปลือกไม้ พบว่ามีผลต่อเชื้อยีสต์ *Candida albicans* จากการทดสอบโดยวิธี agar disc diffusion เกิดโซนใสที่มีความกว้างมากกว่า 40 มิลลิเมตร และ วิธี MIC มีค่าเท่ากับ 0.07-1.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และได้จำแนกชนิดของสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยอบเชยโดยใช้วิธี GC-MS พบสาร 9 ชนิด ซึ่งมีน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 99.24 และสารประกอบหลัก

คือ *trans*-cinnamaldehyde (ร้อยละ 68.95), benzaldehyde (ร้อยละ 9.94) และ *trans*-cinnamyl acetate (ร้อยละ 7.44)

Radulović และคณะ (2013) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยโกลจุพาลัมพา ที่มีผลต่อเชื้อรา พบว่า *Aspergillus fumigatus* มีค่า MIC เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ *Candida albicans* มีค่า MIC เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้จำแนกชนิดของสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยโกลจุพาลัมพาโดยใช้วิธี GC-MS พบสารประกอบทั้งหมด 58 ชนิด ซึ่งมีน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 96 และสารประกอบหลักคือ artemisia ketone (ร้อยละ 35.7), α -pinene (ร้อยละ 16.5) และ 1,8-cineole (ร้อยละ 5.5)

Policegoudra และคณะ (2012) ได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยว่านเต่าเกียดที่มีผลต่อเชื้อราพบว่า *Microsporum fulvum*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton beigelii* และ *Candida albicans* มีค่า MIC เท่ากับ 10, 12, 8, 12, 10 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และได้จำแนกชนิดของสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยว่านเต่าเกียดโดยใช้วิธี GC-MS พบสารประกอบทั้งหมด 55 ชนิด ซึ่งมีน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 55 และสารประกอบหลักคือ linalool (ร้อยละ 62.5), terpene-4-ol (ร้อยละ 7.08), δ -cadinene (ร้อยละ 5.57), T-muurolol (ร้อยละ 5.32), α -cadinol (ร้อยละ 3.71), viridiflorol (ร้อยละ 3.69), α -selinene (ร้อยละ 2.19), M-cymene (ร้อยละ 2.19), spatulenol (ร้อยละ 1.81) และ γ -Muurolene (ร้อยละ 1.81)

Tarek และคณะ (2014) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพืชสมุนไพร กานพลูที่มีผลต่อจุลินทรีย์พบว่าเชื้อรา *Aspergillus niger* และยีสต์ *Candida albicans* มีค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร

2.19.2 สมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหย

Shahwar และคณะ (2012) ได้ศึกษาการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) ของน้ำมันหอมระเหยว่านนางคำ พบว่ามีค่า FRAP equivalent เท่ากับ 130.6 ไมโครโมล

Al-Reza และคณะ (2010) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยว่านนางคำ พบว่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 14.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Radulović และคณะ (2013) ได้ศึกษาได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยโกลจุพาลัมพา พบว่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH ให้ค่า EC_{50} เท่ากับ 2.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวิธี FRAP⁺ ให้ค่า EC_{50} เท่ากับ 0.640 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

วัสดุที่ใช้ในการทดลอง คือ พืชสมุนไพรทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ ว่านน้ำ ข่า โกงฐเชียง โกงฐจุฬาลัมพา อบเชย ว่านนางคำ ว่านเต่าเกียด เปราะหอม และกานพลู (ตารางที่ 3.1) โดยสมุนไพรทั้งหมดที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นสมุนไพรแห้งซึ่งมาจากร้านขายสมุนไพรในกรุงเทพมหานคร

ตารางที่ 3.1 สมุนไพรที่นำมาใช้ในการกลั่นน้ำมันหอมระเหย

ชนิดของสมุนไพร	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่นำมาใช้	องค์ประกอบทางเคมี
ว่านน้ำ	Sweet flag, Calamus	<i>Acorus calamus</i>	เหง้าแห้ง	β -asarone (33.36%), <i>cis</i> -beta-terpineol (23.44%), limonene (13.08%), carvone (5.64%) และ amyl isovalerate (4.92%) (Senthilkumar และ Venkatesalu, 2012)
ข่า	Greater galangal	<i>Alpinia galangal</i>	เหง้าแห้ง	1,8-cineole (63.4 %), <i>trans</i> - β -farnesene (8.4%), eugenol acetate (3.3%) และ terpinen-4-ol (2.8%) (Raina และคณะ, 2014)
โกงฐเชียง	Dong quai	<i>Angelica sinensis</i>	ราก	6,7-dihydroxyligustilide (36.07%), senkyunolide I (35.64%) และ senkyunolide H (35.19%) (Lao และคณะ, 2004)
โกงฐจุฬาลัมพา	Sweet wormwood	<i>Artemisia annua</i>	ทั้งต้น	artemisia ketone (35.7%), α -pinene (16.5%) และ 1,8-cineole (5.5%) (Radulović และคณะ, 2013)

ตารางที่ 3.1 สมุนไพรที่นำมาใช้ในการกลั่นน้ำมันหอมระเหย (ต่อ)

ชนิดของสมุนไพร	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่นำมาใช้	องค์ประกอบทางเคมี
อบเชย	Cinnamon	<i>Cinnamomum verum</i>	เปลือกของลำต้น	<i>trans</i> -cinnamaldehyde (68.95 %), benzaldehyde (9.94 %) และ <i>trans</i> -cinnamyl acetate (7.44%) (Unlu และคณะ, 2010)
ว่านนางคำ	Wild turmeric	<i>Curcuma aromatica</i>	เหง้าแห้ง	camphor (26.32%), borneol (16.45%), vinyl dimethyl carbinol (12.21%), caryophyllene oxide (6.33%), cubenol (5.59%), cucumber alcohol (5.19%), ledol (3.84%), และ germacrene D (3.45%) (Al-Reza และคณะ, 2010)
ว่านเต่าเกียด	Colla aromatica Roxb., Sugandh mantri	<i>Homalomena aromatic</i>	เหง้าแห้ง	linalool (62.5%), terpene-4-ol (7.08%), δ -cadinene (5.57%), T-muurolol (5.32%), α -cadinol (3.71%), viridiflorol (3.69%), α -selinene (2.19%) และ M-cymene (2.19%) (Policegoudra และคณะ, 2012)
เปราะหอม	Cekor	<i>Kaempferia galanga</i>	เหง้าแห้ง	ethyl-p-methoxycinnamate (31.77%), methylcinnamate (23.23%), carvone (11.13%), eucalyptol (9.59%) และ pentadecane (6.41%) (Tewtrakul และคณะ, 2005)
กานพลู	Clove	<i>Syzygium aromaticum</i>	ดอกตูม	eugenol (86.34 %), <i>trans</i> -caryophyllene (8.20 %), eugenol acetate (3.58 %) และ α -Humulene (0.83 %) (Santoro และคณะ, 2007)

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Aspergillus terreus* TISTR 3109, *Aspergillus niger* TISTR 3245, *Aspergillus versicolor* TISTR 3460, *Alternaria alternata* TISTR 3282, *Penicillium citrinum* TISTR 3437, *Rhizopus stolonifer* TISTR 3144, *Trichoderma harzianum* TISTR 3608, *Geotrichum candidum* TISTR 3442, *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276, *Aspergillus ochraceus* TISTR 3557 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155, *Hanseniaspora uvarum* TISTR 5153, *Candida albicans* TISTR 5779, *Schizosaccharomyces pombe* TISTR 5205, *Candida lipolytica* TISTR 5655, *Pichia membranaefaciens* TISTR 5093, *Rhodotorula glutinis* TISTR 515 และ *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044 ได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA) Yeast Malt Agar (YMA) Yeast Malt Broth (YMB) และสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1

3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ โซเดียมซัลเฟตแอนไฮไดรอส (Anhydrous sodium sulphate) ทวิน 80 (Tween 80) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide หรือ DMSO, CaelovErba, Italy) ยาปฏิชีวนะแอมโฟเทอริซินบี (Amphotericin B, M&H Manufacturing) เมทานอล (Methanol, Avantor Performance Materials, inc., USA) เอทานอล (Ethanol, Avantor Performance Materials, inc., USA), 2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH, Aldrich, Sigma-Aldrich, Switzerland) โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate หรือ $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$), กรดอะซิติก ($C_2H_4O_2$) กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid หรือ HCl), 2,4,4-tripyridyl-5-triazine (TPTZ) เฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride หรือ $FeCl_3 \cdot 6H_2O$) เฟอรัสซัลเฟต (Ferrous sulfate หรือ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$) 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic-acid) diammonium salt (ABTS, Sigma, Sigma-Aldrich, Switzerland) โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate หรือ $K_2S_2O_8$) โซเดียมไนไตรท์ (Sodium nitrite หรือ $NaNO_2$) อะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminium chloride หรือ $AlCl_3$) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide หรือ NaOH) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate หรือ Na_2CO_3) คาเทชิน (Catechin, Aldrich, Sigma-Aldrich, Switzerland) สาร Folin-Cocalteu (Folin-ciocalteu's phenol, Fluka, Switzerland) กรดแกลลิก (gallic acid, Fluka, Switzerland) กรดแอสคอร์บิก โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide หรือ NaOH) แอลฟา-โทโคฟีรอล (α -tocopherol, Fluka,

Switzerland), BHT และ 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox, Aldrich, Sigma-Aldrich, United States)

3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย (Clevenger's apparatus) ตู้อบลมร้อน (Memmert, UFE 600) ตู้บ่มเชื้อ (Memmert, INP 600) ตู้เย็น (SANYO, SR-F383) ตู้แช่เชื้อ (BossTech, VT 90) หม้อนึ่งความดัน (TOMY, ES-315) เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer, VORTEX GENIE 2, G560E) ไมโครปิเปตขนาด 20-200 ไมโครลิตร (eppendorf, USA) ไมโครปิเปตขนาด 500- 5000 ไมโครลิตร (eppendorf, USA) ไมโครปิเปตขนาด 2-20 ไมโครลิตร (Thermo Scientific, USA) ไมโครปิเปตขนาด 10-100 ไมโครลิตร (BIOHIT, USA) ไมโครปิเปตขนาด 100-1000 ไมโครลิตร (BIOHIT, USA) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer, Shimadzu, UV-1601, Australia) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge, FALCON, 6/300) กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เครื่องบดผสม เครื่องวัดพีเอช กล้องจุลทรรศน์ ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) ตะเกียงแอลกอฮอล์ ปากคีบ เข็มเขี่ยเชื้อ ลูบเขี่ยเชื้อ แท่งแก้ววอ กรวยแก้วกรองสาร และอุปกรณ์เครื่องแก้วอื่นๆที่จำเป็น

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร

น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ เตรียมโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ โดยใช้เครื่อง Clevenger's apparatus เริ่มจากการนำพืชสมุนไพรแห้งมาบั่นหรือบดให้มีขนาดเล็ก ชั่งพืชสมุนไพรแห้งปริมาณ 150 กรัม ใส่ลงในขวดกลั่น เติมน้ำกลั่นจนท่วมพืช ให้ความร้อนประมาณ 3-4 ชั่วโมง รอนจนกระทั่งปริมาณน้ำมันที่ได้นั้นคงที่จึงหยุดให้ความร้อน และจดบันทึกปริมาณน้ำมันที่ได้ จากนั้นทำการกำจัดน้ำออกโดยเติมสารโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสให้มากเกินพอ และกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บรักษาน้ำมันหอมระเหยนั้นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในขวดแก้วสีชาเพื่อสามารถนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.2.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

3.2.2.1 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้ง 12 ชนิด บนอาหาร PDA slant ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อราเจริญเต็มที่และเกิดการสร้างสปอร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ใส่ลงในหลอดอาหาร PDA slant ที่มีเชื้อราเจริญอยู่แล้วใช้พาสเจอร์ปิเปตที่ปราศจากเชื้อชุดเบาๆ เพื่อให้สปอร์หลุดออกมา จากนั้นกรองเอาเส้นใยออก โดยการกรองผ่านกรวยกรองที่บุสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อได้สปอร์แขวนลอยแล้วให้นำไปนับสปอร์ด้วย

haemocytometer ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วย Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

3.2.2.2 การเตรียมสารแขวนลอยของเซลล์ยีสต์

ทำการเพาะยีสต์ทั้ง 8 ชนิด ในอาหาร YMA slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งไป จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้งในการล้างเซลล์แต่ละครั้งทำได้โดยการเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงไปแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกับข้างต้น เทส่วนใสทิ้ง แล้วจึงทำให้ได้สารแขวนลอยเซลล์โดยการเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปรับความขุ่นของเซลล์แขวนลอยให้เท่ากับ Mcfarland Standard เบอร์ 6 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เป็น 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1

3.2.3 การศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย

3.2.3.1 การศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์โดยวิธี Agar disc diffusion

ทำการทดลองตามวิธีของ Collins และคณะ (2001) โดยทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเตรียมสารแขวนลอยเซลล์สำหรับยีสต์และสารแขวนลอยสปอร์สำหรับเชื้อรา นำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์มาทดสอบโดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในสารแขวนลอยเซลล์และกดด้านข้างหลอดเพื่อไม่ให้สำลีชุ่มเกินไป จากนั้นทำการ swab ที่ผิวหน้าอาหาร YMA ส่วนเชื้อราทำการปิเปตสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงที่ผิวหน้าอาหาร PDA และใช้แท่งแก้วจุ่มให้ทั่วผิวหน้าอาหาร รอให้ผิวหน้าอาหารแห้งแล้ววางกระดาษกรองขนาด 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงตรงกลางผิวหน้าอาหาร หลังจากนั้นปิเปตน้ำมันหอมระเหยปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรอง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สำหรับยีสต์ และ 7 วัน สำหรับเชื้อรา วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone ในหน่วยมิลลิเมตร แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ยโดยทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ

Negative control ทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่ใช้ DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 แทนน้ำมันหอมระเหย ส่วน Positive control ใช้ยาแอมโฟเทอริซินบีที่ความเข้มข้น 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 และ 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยใช้วิธี serial two-fold dilutions (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ข)

3.2.3.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ (MIC) โดยวิธี Agar dilution

ทำการทดลองตามวิธีของ Şahin และคณะ (2004) โดยทำการเตรียม stock solution ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดในสารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับยีสต์ใช้ YMA สำหรับเชื้อราใช้ PDA ที่มีน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้นสุดท้ายต่างกัน 17 ระดับ (20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031, 0.015 และ 0.0078 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยทำการเติมน้ำมันหอมระเหยจาก stock ที่ความเข้มข้นที่ได้ทำการเตรียมไว้คือ 500, 50, 5 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตรที่เหมาะสมโดยปริมาตรน้ำกลั่นเมื่อรวมกับปริมาตรน้ำมันหอมระเหยที่เตรียมไว้แล้วต้องรวมกันแล้วได้ 125 ไมโครลิตร จากนั้นเปิดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังหลอมเหลวอยู่ที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 2,375 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันดีแล้วนำมาเอียงเพื่อให้ได้หลอดอาหารที่มีผิวหน้าเอียงรอให้อาหารแข็งตัว จากนั้นจึงทำการเพาะเชื้อ (inoculation) สำหรับเชื้อราให้หยดสปอร์แขวนลอยที่ได้เตรียมไว้แล้วตามข้อ 3.2.2.1 ลงตรงกลางที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อหลอด ส่วนยีสต์ให้นำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้เตรียมไว้แล้วตามข้อ 3.2.2.2 มาทำการ simple streak ที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน สำหรับเชื้อรา และเป็นเวลา 3 วัน สำหรับยีสต์ เมื่อครบกำหนดบ่มแล้วทำการประเมินผลโดยดูที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่ไม่พบการเจริญก็จะให้เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) ซึ่งมาจากค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ โดยทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ

Negative control ทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่ใช้ DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 แทนน้ำมันหอมระเหย ส่วน Positive control ใช้ยาแอมโฟเทอริซินบีที่ความเข้มข้นสุดท้าย 6 ระดับ (0.72, 0.36, 0.18, 0.09, 0.045 และ 0.0225 สำหรับเชื้อรา; 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 และ 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับยีสต์) เตรียมโดยใช้วิธี serial two-fold dilutions (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ข)

3.2.3.3 การศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดรวมกันที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์

ก. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเตรียมเชื้อราและยีสต์ตามวิธีการข้อ 3.2.2 ให้ได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 1.0×10^6 CFUต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบ

ข. ทดสอบด้วยวิธี Agar dilution checkerboard

ทำการทดสอบผลของน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิด จำนวน 3 คู่ โดยคู่ที่ 1 เป็นน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลู คู่ที่ 2 เป็นน้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และคู่ที่ 3 เป็นน้ำมัน

กานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียด ในการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์โดยวิธี checkerboard โดยทำการทดลองตามวิธีของ Rosato และคณะ (2007) ขั้นแรกทำการเตรียม stock solution ของน้ำมันอบเชย น้ำมันกานพลู และน้ำมันว่านเต่าเกียด ในสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ทำการปิเปต stock solution ของน้ำมันอบเชย และน้ำมันกานพลู ของคู่ที่ 1 อย่างละ 0.5 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 : 1) ลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้นเทอาหาร PDA สำหรับเชื้อรา และอาหาร YMA สำหรับยีสต์ ที่ยังหลอมเหลวอยู่ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงไปในปริมาตร 19 มิลลิลิตร เพื่อให้ในจานเพาะเชื้อมีระดับความเข้มข้นเป็น 1/2, 1/4, 1/8 และ 1/16 เท่าของค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดซึ่งได้จากผลของวิธีการทดลองในข้อ 3.2.3.2 ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัวแล้วจึงหยดสารแขวนลอยสปอร์สำหรับเชื้อราและสารแขวนลอยเซลล์สำหรับยีสต์ (1.0×10^6 CFUต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงไปตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนน้ำมันคู่ที่ 2 และคู่ที่ 3 ก็ทำเช่นเดียวกับน้ำมันคู่ที่ 1 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สำหรับเชื้อราและ 3 วันสำหรับยีสต์ จากนั้นทำการประเมินผลของน้ำมันหอมระเหยโดยคำนวณเป็นค่าของ fractional inhibitory concentration (FIC) การคำนวณค่า FIC index (FICI) มีสูตรดังนี้

$$\text{FIC index} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B$$

เมื่อ $\text{FIC}_A =$ ค่า MIC ของน้ำมันระเหยชนิด A (MIC_A combination) เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม / ค่า MIC ของน้ำมันระเหย A เพียงอย่างเดียว (MIC_A alone)

$\text{FIC}_B =$ ค่า MIC ของน้ำมันระเหยชนิด B (MIC_B combination) เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม / ค่า MIC ของน้ำมันระเหย B เพียงอย่างเดียว (MIC_B alone)

โดยค่า $\text{FIC} \leq 0.5$ หมายถึงเสริมฤทธิ์กัน (total synergism)
 $0.5 < \text{FIC} \leq 0.75$ หมายถึงเสริมฤทธิ์กันบางส่วน (partial synergism)
 $0.75 < \text{FIC} \leq 2$ หมายถึงไม่มีผล (no effect)
 $\text{FIC} > 2$ หมายถึงเป็นปฏิปักษ์กัน (antagonism)
 (Pekmezovic และคณะ, 2015)

3.2.4 สมบัติทางพิษเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย

3.2.4.1 การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทย

3.2.4.1.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay)

ทำการทดลองตามวิธีการของ Singh และคณะ (2008) โดยนำน้ำมันหอมระเหยที่ได้ทั้ง 9 ชนิดมาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่ 1, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยสารละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์จากนั้นปิเปตสารละลายน้ำมันหอมระเหยที่เจือจางมา 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร (ตามวิธีในภาคผนวก ค) ป่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลแทนน้ำมันหอมระเหยเป็นชุดควบคุม และใช้แอลฟา-โทโคฟีรอลและบีเอชที่เป็น positive control ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นนำไปคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งของ DPPH radical ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\%I = \frac{(A_0 - A_s)}{A_s} \times 100$$

A_0 คือค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_s คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย

จากนั้นนำค่าร้อยละของการยับยั้งโดย DPPH กับค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟเพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} เป็นค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถกำจัด DPPH radical ได้ร้อยละ 50

3.2.4.1.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay)

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Lado และคณะ (2004) โดยมีสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ คือ FRAP reagent ซึ่งประกอบด้วย acetate buffer ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และสารละลาย Ferric chloride hexahydrate ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร สามารถทำการวิเคราะห์ได้โดยปิเปต FRAP reagent ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ป่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยเทียบกับ FRAP reagent ที่ไม่มีตัวอย่างของน้ำมันหอมระเหย ซึ่งใช้เป็น blank และนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่ได้นั้นมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ซึ่งการทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย ferrous sulfate heptahydrate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) ที่ความเข้มข้น 0.047, 0.094, 0.188, 0.375, 0.750, 1.500 และ 3.000 มิลลิโมลาร์ (ตามวิธีการในภาคผนวก ค) โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น แต่ใช้สารละลาย ferrous

sulfate heptahydrate แทนน้ำมันหอมระเหย และสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับระดับความเข้มข้นของสารละลาย ferrous sulfate heptahydrate ซึ่งจะได้กราฟแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง และหาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของ ferrous sulfate heptahydrate

3.2.4.1.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยด้วยวิธี ABTS radical cation decolorization assay

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Re และคณะ (1999) โดยทำการเตรียม Stock solution ที่มีส่วนผสมของสารละลาย ABTS ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และสารละลาย Potassium persulfate ที่ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วทำการผสม Stock solution ของสารละลายทั้งสองด้วยอัตราส่วน 1:1 เก็บสารละลายผสมไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาเจือจางด้วยเอทานอลจนได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (สารละลาย ABTS ที่ใช้ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำกรทดลอง) จากนั้นนำตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ทำการเตรียม Blank โดยผสมสารตัวอย่างเหมือนการทดลองข้างต้นแต่ใช้เมทานอลแทนน้ำมันหอมระเหย คำนวณกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานทรลือกซ์จากนั้นรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของทรลือกซ์ต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย การทำกราฟมาตรฐานทรลือกซ์ทำได้ดังนี้

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานทรลือกซ์ที่ความเข้มข้น 1,000, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.5625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการทดลองตามวิธีการหาปริมาณที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ใช้สารละลายทรลือกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ แทนน้ำมันหอมระเหยแล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาพลอตกราฟกับความเข้มข้นของสารละลายทรลือกซ์จะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง หาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณปริมาณที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ ของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่วิเคราะห์

3.2.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Dastmalchi และคณะ (2007) โดยทำการเตรียมน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปิเปตน้ำมันหอมระเหยปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร

เติมน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (ultra pure water) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร เติมสาร Folin-Cocalteu's phenol reagent ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที เติมสารละลาย Na_2CO_3 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จะให้สารละลายเป็นสีน้ำเงิน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก จากนั้นรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย การทำกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกทำได้ดังนี้

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1,000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการทดลองตามวิธีการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ใช้สารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ แทนน้ำมันหอมระเหยแล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟกับความเข้มข้นของสารละลายกรดแกลลิกจะมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง หาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่วิเคราะห์

3.2.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Kathirvel และ Sujatha (2012) โดยเปิดน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 75 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 150 ไมโครลิตรลงไป ทิ้งไว้เป็นเวลา 6 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 275 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นั้นมาคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของคาเทชิน จากนั้นรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของคาเทชินต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย การทำกราฟมาตรฐานของคาเทชินทำได้ดังนี้

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานคาเทชินที่ความเข้มข้น 1,000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการทดลองตามวิธีการหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ใช้สารละลายคาเทชินที่ความเข้มข้นต่างๆ แทนน้ำมันหอมระเหยจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟกับความเข้มข้นของสารละลายคาเทชินจะมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง หาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่วิเคราะห์

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพืชสมุนไพร

เมื่อนำพืชสมุนไพรทั้ง 9 ชนิดมาทำการกลั่นด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำโดยใช้เครื่อง Clevenger's apparatus (ตารางที่ 4.1) พบว่าพืชสมุนไพรที่มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากกว่าร้อยละ 1.0 ได้แก่ กานพลู ว่านนางคำ และอบเชย โดยกานพลูมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด (ร้อยละ 4.0) ส่วนว่านน้ำ ช่า โกฎเชียง โกฎจุฬาลัมพา ว่านเต่าเกียด และเปราะหอมมีปริมาณน้ำมันหอมระเขยน้อยกว่าร้อยละ 1.0 โดยโกฎเชียงและโกฎจุฬาลัมพามีปริมาณน้ำมันหอมระเขยน้อยที่สุด (ร้อยละ 0.2)

ตารางที่ 4.1 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพืชสมุนไพรแต่ละชนิด

ชนิดสมุนไพรพืชสมุนไพร	ปริมาณน้ำมันหอมระเหย ^a \pm SD (มิลลิลิตร/น้ำหนักพืชแห้ง 150 กรัม)
ว่านน้ำ	0.6 \pm 0.08
ช่า	0.4 \pm 0.04
โกฎเชียง	0.2 \pm 0.08
โกฎจุฬาลัมพา	0.2 \pm 0.04
อบเชย	1.0 \pm 0.08
ว่านนางคำ	2.0 \pm 0.16
ว่านเต่าเกียด	0.6 \pm 0.19
เปราะหอม	0.7 \pm 0.08
กานพลู	4.0 \pm 0.56

^a ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

4.2 สมบัติการต้านเชื้อราและยีสต์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย

4.2.1 ผลการศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรด้วยวิธีการแพร่บนอาหารวุ้น (Agar disc diffusion) และวิธีการเจือจางในอาหารแข็ง (Agar dilution)

จากผลการศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจำนวนทั้งหมด 12 ชนิดของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรทั้งหมด 5 ชนิด (ตารางที่ 4.2.1.1 และ 4.2.1.3) พบว่าน้ำมันเปราะหอมและน้ำมันว่านน้ำ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ค่อนข้างหลากหลายชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรชนิดอื่น (เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งของน้ำมันว่านน้ำอยู่ระหว่าง 8.81 ถึง 16.21 มิลลิเมตร และของน้ำมันเปราะหอมอยู่ระหว่าง 8.40 ถึง 13.34 มิลลิเมตร) แต่ฤทธิ์ในการยับยั้งไม่สูงมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันอบเชย น้ำมันกานพลู และน้ำมันว่านเต่าเกียด ซึ่งมีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งค่อนข้างกว้าง โดยน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทดสอบได้ดีที่สุดคือ น้ำมันอบเชย เนื่องจากค่า MIC ของการยับยั้งการเจริญของเชื้อราส่วนใหญ่มีค่าต่ำกว่าค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพืชสมุนไพรชนิดอื่น โดยเชื้อราส่วนใหญ่ถูกยับยั้งได้ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นเชื้อ *A. niger*, *A. parasiticus*, *R. stolonifera* และ *T. harzianum* ซึ่งถูกยับยั้งได้ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำมันกานพลูเป็นน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี เช่นเดียวกันเนื่องจากเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งการเจริญของเชื้อราส่วนใหญ่ค่อนข้างกว้าง (20.26 ถึง 47.76 มิลลิเมตร) แต่ค่า MIC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทุกชนิดเท่ากันคือ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนน้ำมันว่านเต่าเกียดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ตรงลงมา แต่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทุกชนิดที่ทดสอบไม่กว้างนัก (12.55 ถึง 19.42 มิลลิเมตร และค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.5 ถึง 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยเชื้อ *A. versicolor* มีความไวต่อการถูกยับยั้งการเจริญมากที่สุด (ค่า MIC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนน้ำมันเปราะหอมและน้ำมันว่านน้ำมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ไม่ดีนักเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรชนิดอื่นดังที่กล่าวมาแล้ว น้ำมันเปราะหอมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. parasiticus*, *P. citrinum* และ *T. harzianum* ได้ดีที่สุดใน โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อราชนิดอื่นถูกยับยั้งด้วยน้ำมันเปราะหอมที่ค่า MIC เท่ากับ 4-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในกรณีของน้ำมันว่านน้ำสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. flavus*, *F. moniliforme* และ *T. harzianum* ได้ดีที่สุดใน โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อราชนิดอื่นค่อนข้างต้านทานต่อการถูกยับยั้งด้วยน้ำมันว่านน้ำ (มีค่า MIC เท่ากับ 8-18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากผลการศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์จำนวนทั้งหมด 8 ชนิดของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรทั้งหมด 5 ชนิด (ตารางที่ 4.2.1.2 และ 4.2.1.4) พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่

สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ทุกชนิดที่ทดสอบได้แก่ น้ำมันอบเชย น้ำมันวานเต่าเกียด น้ำมันเปราะหอม และน้ำมันกานพลู โดยน้ำมันอบเชยมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ได้ดีมากที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งกว้างมากที่สุด (16.53 ถึง 45.79 มิลลิเมตร) และมีค่า MIC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ทุกชนิดที่ทดสอบเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนน้ำมันกานพลูมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ได้ค่อนข้างดีเช่นเดียวกัน เนื่องจากมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งส่วนใหญ่ค่อนข้างกว้าง มีค่า MIC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ส่วนใหญ่ที่ทดสอบเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นเชื้อ *C. lipolytica* ซึ่งค่อนข้างไวต่อการถูกยับยั้งด้วยน้ำมันกานพลูมากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำมันวานเต่าเกียดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ได้ดีรองจากน้ำมันอบเชยและน้ำมันกานพลู โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งอยู่ระหว่าง 8.31 ถึง 22.66 มิลลิเมตร (ค่า MIC เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) น้ำมันวานเต่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ที่ทดสอบส่วนใหญ่ได้ดี (ค่า MIC เท่ากับ 0.125 ถึง 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เชื้อยีสต์ส่วนใหญ่ที่ทดสอบถูกยับยั้งได้ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นเชื้อ *C. lipolytica* และ *H. uvarum* ถูกยับยั้งได้ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำมันเปราะหอมมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ส่วนใหญ่ต่อยกกว่าน้ำมันที่ได้จากพืชสมุนไพรชนิดอื่นที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เนื่องจากมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งอยู่ในช่วงที่แคบกว่า (8.69 ถึง 15.68 มิลลิเมตร) โดยพบว่าเชื้อยีสต์เพียงชนิดเดียวคือ *D. hansenii* ที่ค่อนข้างไวต่อการถูกยับยั้งด้วยน้ำมันเปราะหอมมากที่สุดมีค่า MIC เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเชื้อ *C. lipolytica* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ *Z. rouxii* มีความต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันเปราะหอมมากที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อยีสต์ชนิดอื่นมีฤทธิ์ต่อการถูกยับยั้งการเจริญโดยน้ำมันเปราะหอมไม่แตกต่างกัน มีค่า MIC เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับการศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจำนวนทั้งหมด 12 ชนิดและเชื้อยีสต์ทั้งหมด 8 ชนิดของยาแอมโฟเทอริซินบีที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิด ได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยบางชนิด (มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.0225 ถึงมากกว่า 0.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยยับยั้งเชื้อ *A. alternate* ได้ดีที่สุด มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง 15.89 มิลลิเมตร และมีค่า MIC เท่ากับ 0.0225 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยับยั้งเชื้อ *A. niger* ได้ดีรองลงมา (มีค่า MIC เท่ากับ 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งเชื้อ *A. ochraceus*, *A. terreus*, *F. moniliforme*, *R. stolonifera* และ *T. harzianum* มีความต้านทานต่อการถูกยับยั้งด้วยยาแอมโฟเทอริซินบีมากที่สุด โดยมีค่า MIC มากกว่า 0.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ทุกชนิดได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยทุกชนิดที่ทดสอบ และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ได้ดีโดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.05 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นเชื้อ *C. albicans* และ *D. hansenii* ที่มีความต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยยาแอมโฟเทอริซินบีมากที่สุด โดยมีค่า MIC มากกว่า 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดลองนี้ น้ำมันว่านน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์หลายชนิดได้ดีที่ค่า MIC อยู่ในช่วง 0.125 ถึงมากกว่า 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับรายงานการวิจัยของ Devi และ Ganjewala (2009) ซึ่งได้พบว่าสารสกัดจากเหง้าของว่านน้ำ (*Acorus calamus* L.) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้เช่น *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus Flavus*, *Microsporum canis*, *Cryptococcus gastricus* และ *Candida albicans* โดยมีค่า MIC ระหว่าง 3-32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กิจกรรมการต้านเชื้อราและยีสต์อาจเป็นผลมาจากสารประกอบในน้ำมันว่านน้ำ มีรายงานว่าน้ำมันว่านน้ำประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิด Senthikumar และ Venkatesalu (2012) ได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันจากเหง้าของว่านน้ำ (*Acolus calamus* L.) โดยใช้วิธี Gas Chromatography (GC) และ Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS) พบว่ามีสารประกอบ 20 ชนิด โดยมีสารประกอบหลักได้แก่ β -asarone (ร้อยละ 33.36), *cis*- β -terpineol (ร้อยละ 23.44), limonene (ร้อยละ 13.08), carvone (ร้อยละ 5.64), amyl isovalerate (ร้อยละ 4.92), globulol (ร้อยละ 3.28) และสารประกอบอื่นๆ ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 3 สารสำคัญของชนิดที่เป็นส่วนประกอบในน้ำมันว่านน้ำเคยมีผู้รายงานไว้ว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อราเช่น มีรายงานว่า β -asarone ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีมากที่สุดน้ำมันว่านน้ำสามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* ได้ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Rajput และ Karuppayil, 2013) และมีการศึกษาผลของ β -asarone ต่อเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) แสดงให้เห็นว่าเส้นใยและสปอร์เกิดการหดตัวและหลุดร่วงลงเนื่องจากการรื้อไหลของของเหลวภายในเซลล์ (Phongpaichit และคณะ, 2005)

จากการทดลองนี้ น้ำมันอบเชยยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้มากโดยมีค่า MIC ก่อนข้างต่ำผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการรายงานของนักวิจัยท่านอื่น (Simić และคณะ, 2004; Soliman และ Badeaa, 2002) นอกจากนี้ น้ำมันอบเชย (*Cinnamomum verum*) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* ได้ดีมากสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Unlu และคณะ (2010) ที่ได้รายงานว่าน้ำมันอบเชยมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Candida albicans* ได้ดีโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางโซนการยับยั้งที่มากกว่า 40 มิลลิเมตร และ Simić และคณะ (2004) ได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสำคัญในน้ำมันอบเชยด้วยวิธี Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS) พบว่ามีสารประกอบหลักได้แก่ *trans*-cinnamaldehyde (ร้อยละ 62.79), limonene (ร้อยละ 8.31), eugenol (ร้อยละ 7.09) และ cinnamaldehyde propylene (ร้อยละ 5.55) และสารประกอบอื่นๆ ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 2 นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษา กิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria alternata* ให้ค่า MIC เท่ากับ 1.0 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อรา *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. flavus*, *A. terreus* และ *A. versicolor* ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ยังแสดงผลของ MFC พบว่า *Alternaria alternate*, *A. terreus* และ *A. versicolor* ให้ค่า MFC เท่ากับ 0.25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อรา *A. niger*

A. ochraceus และ *A. flavus* ให้ค่า MFC เท่ากับ 0.5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีรายงานว่า cinnamaldehyde และ eugenol ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในน้ำมันอบเชยมีกิจกรรมการต้านเชื้อราได้ดีมาก (Cheng และคณะ, 2006) รวมถึงยีสต์ *Candida albicans* (Bin Jantan และคณะ, 2008)

สำหรับน้ำมันวานแต้เกิดจากผลการทดลองพบว่ามียุทธียับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้หลายชนิด โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.5-2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นักวิจัยท่านอื่นได้เคยรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อราของน้ำมันวานแต้เกิดไว้บ้างเช่น Singh และคณะ (2000) ได้รายงานว่าน้ำมันวานแต้เกิด (จากเหง้าของ *Homalomena aromatica*) มีกิจกรรมต้านเชื้อรา *Curvularia pallescens*, *Aspergillus niger* และ *Fusarium graminearum* ได้ดี Policegoudra และคณะ (2012) ได้ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสำคัญในน้ำมันวานแต้เกิดด้วยวิธี GC-MS พบว่ามีสารประกอบหลักได้แก่ linalool (ร้อยละ 62.5), terpene-4-ol (ร้อยละ 7.08), δ -cadinene (ร้อยละ 5.57), α -cadinol (ร้อยละ 3.71) และ spatulenol (ร้อยละ 1.81) นอกจากนี้ยังมีกิจกรรมต้านเชื้อราในกลุ่ม Dermatophyte เช่น *Microsporum fulvum*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichosporon beigeli* และยีสต์ *Candida albicans* ได้ดี Magiatis และคณะ (1999) ได้กล่าวว่าสารประกอบ α -pinene มีกิจกรรมต้านเชื้อราได้ นอกจากนี้สารประกอบ α -terpineol, linalool และ Terpinen-4-ol ได้มีการรายงานว่ายับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ *Candida albicans* ได้ดี (Carson และ Riley, 1995)

ในการทดลองครั้งนี้ น้ำมันเปราะหอมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้ดี เช่นเดียวกับรายงานของ Tewtrakul และคณะ (2005) ที่ได้พบว่า *C. albicans* ถูกยับยั้งโดยน้ำมันจากเหง้าของเปราะหอม (*Kaempferia galanga*) โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนการยับยั้งเท่ากับ 31 มิลลิเมตร นอกจากนี้ Kochuthressia และคณะ (2012) ยังได้รายงานอีกว่าสารสกัดจากเหง้าของเปราะหอมโดยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus*, *A. niger* และ *C. albicans* ได้ โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนการยับยั้งเท่ากับ 15.3, 16.3 และ 12.2 มิลลิเมตร ตามลำดับ Sahoo และคณะ (2014) ได้ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเปราะหอมที่ได้จากเหง้าโดยวิธี GC/MS พบว่ามีสารประกอบหลักได้แก่ ethyl-*p*-methoxy cinnamate (area peak ร้อยละ 82.01), ethyl cinnamate (area peak ร้อยละ 9.69), 3-carene (area peak ร้อยละ 3.41) และ eucalyptol (area peak ร้อยละ 1.60)

การทดลองนี้ น้ำมันกานพลูยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้ดีมากเช่นเดียวกับรายงานของ Pinto และคณะ (2009) ซึ่งพบว่า *A. flavus* และ *A. niger* ถูกยับยั้งได้ดีโดยน้ำมันกานพลู (*Syzygium aromaticum*) ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.64 และ 0.32 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ Xing และคณะ (2012) ได้รายงานการศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ *Rhizorus nigricans*, *A. flavus* และ *P. citrinum* โดยน้ำมันกานพลูพบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 50, 25 และ 25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ Rana และคณะ (2011) ยังรายงานว่าน้ำมันกานพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิดได้ดีมากเช่น *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *Mucor* sp. และ *Aspergillus* sp. และยังตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ถึงการแตกและการเสียชีวิตของสปอร์เชื้อราทุกชนิดที่ตรวจสอบหลังจากการแช่ไมซีเลียมที่มีสปอร์กับน้ำมันกานพลู 50 ไมโครลิตรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนฤทธิ์ยับยั้งยีสต์โดยน้ำมันกานพลูได้เคยมีการรายงานเช่นเดียวกันดังการรายงานของ Gayoso และคณะ (2005) ซึ่งได้พบว่าน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 สามารถ

ยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* และ *G. candidum* ได้โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนการยับยั้งเท่ากับ 14 และ 23 มิลลิเมตร ตามลำดับ กิจกรรมการต้านเชื้อราและยีสต์ของน้ำมันกานพลู พบว่าเป็นผลมาจากสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันกานพลู Razafimamonjison และคณะ (2014) ได้จำแนกชนิดสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบใน clove bud oil ด้วยวิธี Gas chromatography (GC) พบว่ามีสารประกอบหลักคือ eugenol (ร้อยละ 72.08-82.36), eugenyl acetate (ร้อยละ 8.61-21.32) และ β -caryophyllene (ร้อยละ 2.76-8.64) และมีรายงานว่า eugenol ที่เป็นสารประกอบหลักในน้ำมันกานพลูมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราและยีสต์หลายชนิดได้ดี เช่น *A. flavus*, *A. niger* และ *C. albicans* (รายงานโดย Pinto และคณะ, 2009) *C. albicans* และ *G. candidum* (รายงานโดย Gayoso และคณะ, 2005) และ *Alternaria alternata*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus* และ *P. citrinum* (รายงานโดย Abbaszadeh และคณะ, 2014)

ตารางที่ 4.2.1.1 สมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยด้วยวิธีการแพร่บนวุ้นอาหาร (Agar disc diffusion method)

ชนิดของเชื้อรา	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง (มม.) ^a ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน					
	ว่านน้ำ	อบเชย	ว่านเต่าเกียด	เปราะหอม	กานพลู	^c Amphotericin B
<i>Alternaria alternata</i>	^b -	-	-	-	-	15.89±6.49
<i>Aspergillus flavus</i>	8.40±0.24	25.47±7.25	13.24±2.80	10.92±1.65	32.25±4.76	9.82±0.53
<i>Aspergillus niger</i>	9.62±0.22	25.74±12.62	15.15±5.72	13.04±2.15	30.54±4.54	11.74±0.40
<i>Aspergillus ochraceus</i>	11.01±1.65	-	13.25±2.34	11.09±2.63	38.38±4.31	7.49±0.40
<i>Aspergillus parasiticus</i>	8.91±0.66	30.14±14.04	12.55±4.45	10.37±2.55	31.26±1.17	8.87±0.70
<i>Aspergillus terreus</i>	8.94±0.69	-	-	8.81±2.73	20.34±8.18	7.12±0.01
<i>Aspergillus versicolor</i>	8.90±0.51	28.36±10.15	15.70±4.16	9.41±0.51	27.05±4.63	10.41±0.82
<i>Fusarium moniliforme</i>	10.97±2.87	-	19.42±2.62	14.69±1.41	47.76±1.30	7.63±0.13
<i>Geotrichum candidum</i>	9.48±1.59	24.94±1.05	12.89±3.04	12.94±0.72	32.47±1.16	12.52±2.12
<i>Penicillium citrinum</i>	10.57±2.22	-	15.90±5.46	11.17±0.67	20.26±0.27	11.62±2.48
<i>Rhizopus stolonifera</i>	13.34±0.92	-	15.44±7.38	16.21±5.12	42.68±3.11	6.66±0.30
<i>Trichoderma harzianum</i>	11.59±2.33	12.79±0.01	-	11.06±0.60	-	10.73±2.28

^a ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ; ^b ไม่พบการยับยั้ง (ไม่เกิดโซนการยับยั้งการเจริญ); ^c Amphotericin B ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml

ตารางที่ 4.2.1.2 สมบัติการยับยั้งการเจริญของยีสต์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยด้วยวิธีการแพร่บนวุ้นอาหาร (Agar disc diffusion method)

ชนิดของยีสต์	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง (มม.) ^a ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน					
	ว่านน้ำ	อบเชย	ว่านเต่าเกียด	เปราะหอม	กานพลู	^c Amphotericin B
<i>Candida albicans</i>	-	42.80±0.08	12.35±0.14	9.43±0.03	18.78±0.04	-
<i>Candida lipolytica</i>	8.81±0.18	23.26±0.21	22.66±0.19	11.52±0.26	32.56±0.13	9.12±0.04
<i>Debaryomyces hansenii</i>	9.76±0.16	16.53±0.20	10.85±1.00	8.86±0.25	7.85±0.02	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	7.59±0.03	18.81±0.58	18.05±0.91	15.57±0.07	38.53±0.68	10.49±0.05
<i>Pichia membranaefaciens</i>	-	45.79±0.04	8.31±0.04	11.83±0.00	22.72±0.07	8.17±0.02
<i>Rhodotorula glutinis</i>	7.41±0.31	24.68±0.93	13.51±0.04	13.07±0.01	20.83±0.00	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	12.64±0.83	27.02±0.07	18.51±0.06	15.68±0.09	35.29±1.47	17.59±0.04
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	-	34.36±0.55	11.60±0.14	8.69±0.16	16.74±0.76	-

^a ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ; ^b ไม่พบการยับยั้ง (ไม่เกิดโซนการยับยั้งการเจริญ); ^c Amphotericin B ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml

ตารางที่ 4.2.1.3 สมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยที่ความเข้มข้นต่ำสุดด้วยวิธีการเจือจางในอาหารแข็ง (Agar dilution)

ชนิดของเชื้อรา	ค่า minimum inhibitory concentration (mg/ml)					
	ว่านน้ำ	อบเชย	ว่านเต่าเกียด	เปราะหอม	กานพลู	Amphotericin B
<i>Alternaria alternata</i>	10	0.125	1	10	0.5	0.0225
<i>Aspergillus flavus</i>	2	0.125	2	10	0.5	0.18
<i>Aspergillus niger</i>	8	0.25	2	10	0.5	0.09
<i>Aspergillus ochraceus</i>	8	0.125	2	8	0.5	>0.72
<i>Aspergillus parasiticus</i>	14	0.25	2	2	0.5	0.36
<i>Aspergillus terreus</i>	16	0.125	2	8	0.5	>0.72
<i>Aspergillus versicolor</i>	18	0.125	0.5	4	0.5	0.18
<i>Fusarium moniliforme</i>	2	0.125	1	2	0.5	>0.72
<i>Geotrichum candidum</i>	14	0.125	1	8	0.5	>0.72
<i>Penicillium citrinum</i>	8	0.125	2	2	0.5	0.18
<i>Rhizopus stolonifer</i>	>20	0.25	1	8	0.5	>0.72
<i>Trichoderma harzianum</i>	2	0.25	2	2	0.5	>0.72

ตารางที่ 4.2.1.4 สมบัติการยับยั้งการเจริญของยีสต์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยที่ความเข้มข้นต่ำสุดด้วยวิธีการเจือจางในอาหารแข็ง (Agar dilution)

ชนิดของยีสต์	ค่า minimum inhibitory concentration (mg/ml)					
	ว่านน้ำ	อบเชย	ว่านเต่าเกียด	เปราะหอม	กานพลู	Amphotericin B
<i>Candida albicans</i>	0.5	0.5	1	4	1	>0.8
<i>Candida lipolytica</i>	0.125	0.5	1	2	0.25	0.05
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0.5	0.5	1	1	1	>0.8
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0.125	0.5	1	4	1	0.05
<i>Pichia membranaefaciens</i>	0.5	0.5	1	4	1	0.1
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0.5	0.5	1	4	1	0.05
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0.5	0.5	1	4	1	0.05
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0.5	0.5	1	8	1	0.05

4.2.2 การศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์

จากการศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยผสมกัน 2 ชนิด ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราพบว่าคู่ผสมของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 คู่ คือน้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันกานพลู น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันกานพลูผสมกับน้ำมันว่านเต่าเกียดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 7 ชนิด ที่ทดสอบ ได้แก่ *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. terreus*, *P. citrinum* และ *T. harzianum* โดยมีค่า MIC ของน้ำมันคู่ผสม (MIC_c) แตกต่างกันดังตารางที่ 4.2.2.1 เมื่อคำนวณหาค่า FIC index ของน้ำมันคู่ผสมทั้ง 3 คู่ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 7 ชนิด ดังกล่าวพบว่าให้ค่า FIC index มากกว่า 0.5 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.75 (FIC index เท่ากับ 0.56-0.66) จึงให้ผล partial synergism ซึ่งหมายความว่าการใช้น้ำมันคู่ผสมทั้ง 3 คู่ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังกล่าวใช้น้ำมันแต่ละชนิดให้ผลเสริมฤทธิ์กันบางส่วนมากกว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว

เมื่อทำการทดสอบอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยผสมกัน 2 ชนิด ต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์ 4 ชนิด พบว่าคู่ผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลูสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ *H. uvarum* ให้ค่า FIC index เท่ากับ 0.75 จึงให้ผล partial synergism ขณะที่ยีสต์ *C. albicans*, *P. membranaefaciens* และ *R. glutinis* ให้ค่า FIC index มากกว่า 0.75 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 (FIC index เท่ากับ 1) จึงให้ผล no effect ส่วนคู่ผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียดพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ดังกล่าวได้ยกเว้น *P. membranaefaciens* พบว่ามีความไวต่อคู่ผสมของน้ำมันชนิดนี้ซึ่งพิจารณาจากค่า FIC index ให้ค่าน้อยกว่า 0.5 (FIC index เท่ากับ 0.31) จึงให้ผล synergism มีความหมายว่าใช้น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันว่านเต่าเกียดในการยับยั้งเชื้อ *P. membranaefaciens* ให้ผลที่เสริมฤทธิ์กันมากกว่าการใช้การใช้้ำมันอบเชยหรือน้ำมันว่านเต่าเกียดเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง ในขณะที่ยีสต์ชนิดอื่นให้ผล partial synergism ต่อคู่ผสมของน้ำมันชนิดนี้เนื่องจากให้ค่า FIC index เท่ากับ 0.56-0.75 และคู่ผสมของน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียดพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ *C. albicans*, *H. uvarum* และ *P. membranaefaciens* ได้โดยให้ผล partial synergism (FIC index เท่ากับ 0.56-0.75) ในขณะที่เชื้อ *R. glutinis* มีความไวต่อคู่ผสมของน้ำมันชนิดนี้ซึ่งพิจารณาจากค่า FIC index ให้ค่าน้อยกว่า 0.5 (FIC index เท่ากับ 0.31) จึงให้ผล synergism (ตารางที่ 4.2.2.2)

จากการศึกษาอิทธิพลน้ำมันอบเชยและน้ำมันกานพลูในรูปแบบน้ำมันผสมต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. terreus*, *P. citrinum* และ *T. harzianum* ให้ค่า fractional inhibitory concentration index (FICI) อยู่ในช่วง 0.56-0.58 Sukatta และคณะ (2008) ได้แสดงผลของกิจกรรมการทำงานร่วมกันของน้ำมันอบเชยและน้ำมันกานพลูที่อัตราส่วนต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. niger*, *Alternaria alternata* และ *R. stolonifer* พบว่ามีค่า FICI เท่ากับ 0.78-1.90, 0.70-1.30 และ 0.65-1.40 ตามลำดับ มีรายงานว่

ผลของน้ำมันอบเชยร่วมกับน้ำมันกานพลูแสดงให้เห็นได้ชัดว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยเพิ่มขึ้น (อัตราส่วน 5:1, 7:1 และ 9:1) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ดีนอกจากนี้ น้ำมันผสมของน้ำมันอบเชยและน้ำมันกานพลูยังสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ *Candida lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens* และ *Zygosaccharomyces rouxii* ในบรรจุภัณฑ์ดัดแปลงบรรยากาศของอาหารได้ดี (Matan และคณะ, 2006) และมีรายงานผลของน้ำมันอบเชยร่วมกับน้ำมันกานพลูต่อเชื้อรา *A. niger*, *Penicillium chrysogenum* และ *Penicillium* sp. ในไม้ยางพาราพบว่าการรวมกันของอบเชยและกานพลูน้ำมันในอัตราส่วน 5:1 และ 7: 1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังกล่าวได้ดีกว่าการใช้ น้ำมันอบเชยและน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว (Matan และ Matan, 2007)

การใช้ น้ำมันหอมระเหยร่วมกัน 2 ชนิด เช่น น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันว่านเต่าเกียดให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *P. membranaefaciens* ได้ดีกว่าการใช้ น้ำมันอบเชยหรือน้ำมันว่านเต่าเกียดชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียวซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากกิจกรรมร่วมกันของสารสำคัญ 2 ชนิด หรือมากกว่า 2 ชนิด ที่เป็นส่วนประกอบในน้ำมันหอมระเหยผสมคูนั้น (Goñi และคณะ, 2009) สำหรับกิจกรรมการเสริมฤทธิ์กันของน้ำมันผสม 3 ได้แก่ น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันกานพลู น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันกานพลูผสมกับน้ำมันว่านเต่าเกียด ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ที่ทดสอบนั้นยังไม่มีรายงานการวิจัยปรากฏสนับสนุนการทดลองนี้ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าพบกิจกรรมการเสริมฤทธิ์ของสารประกอบหลักที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหย เช่น cinnamaldehyde และ thymol ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Bassolé และ Juliani, 2012)

ตารางที่ 4.2.2.1 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยเมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_c) ค่า fractional inhibitory concentration (FIC) และค่า FIC index (FICI) ของน้ำมันผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลู น้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

เชื้อรา	MIC_a		MIC_c		FIC		FICI	การแปลผลค่า FICI
	MIC_{a1}	MIC_{a2}	MIC_{c1}	MIC_{c2}	FIC_1	FIC_2		
น้ำมันอบเชย (1) + น้ำมันกานพลู (2)								
<i>Aspergillus flavus</i>	0.125	0.5	0.008	0.25	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Aspergillus niger</i>	0.25	0.5	0.016	0.25	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.125	0.5	0.008	0.25	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0.25	0.5	0.02	0.25	0.08	0.5	0.58	partial synergism
<i>Aspergillus terreus</i>	0.125	0.5	0.008	0.25	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Penicillium citrinum</i>	0.125	0.5	0.008	0.25	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Trichoderma harzianum</i>	0.25	0.5	0.02	0.25	0.08	0.5	0.58	partial synergism
น้ำมันอบเชย (1) + น้ำมันว่านเต่าเกียด (2)								
<i>Aspergillus flavus</i>	0.125	2	0.02	1	0.16	0.5	0.66	partial synergism
<i>Aspergillus niger</i>	0.25	2	0.02	1	0.16	0.5	0.66	partial synergism
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.125	2	0.008	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0.25	2	0.02	1	0.16	0.5	0.66	partial synergism
<i>Aspergillus terreus</i>	0.125	2	0.008	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Penicillium citrinum</i>	0.125	2	0.008	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Trichoderma harzianum</i>	0.25	2	0.02	1	0.08	0.5	0.58	partial synergism
น้ำมันกานพลู (1) + น้ำมันว่านเต่าเกียด (2)								
<i>Aspergillus flavus</i>	0.5	2	0.03	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Aspergillus niger</i>	0.5	2	0.03	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.5	2	0.03	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0.5	2	0.03	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Aspergillus terreus</i>	0.5	2	0.03	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Penicillium citrinum</i>	0.5	2	0.03	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Trichoderma harzianum</i>	0.5	2	0.03	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism

MIC_{a1} หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันชนิดที่ 1 เพียงชนิดเดียว และ MIC_{a2} หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันชนิดที่ 2 เพียงชนิดเดียว

MIC_{c1} หมายถึงค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม และ MIC_{c2} หมายถึงค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม

FIC_1 คำนวณได้จากค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_{c1}) หารด้วยค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เพียงชนิดเดียว (MIC_{a1})

FIC_2 คำนวณได้จากค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_{c2}) หารด้วยค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เพียงชนิดเดียว (MIC_{a2})

FICI หมายถึงผลรวมของ FIC_1 (FIC ของน้ำมันชนิดที่ 1) กับ FIC_2 (FIC ของน้ำมันชนิดที่ 2)

FICI น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 หมายถึงเสริมฤทธิ์กัน มากกว่า 0.5 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.75 หมายถึงเสริมฤทธิ์กันบางส่วน มากกว่า 0.75 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 หมายถึงไม่มีผล และมากกว่า 2 หมายถึงเป็นปฏิปักษ์กัน

ตารางที่ 4.2.2.2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยเมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_c) ค่า fractional inhibitory concentration (FIC) และค่า FIC index (FICI) ของน้ำมันผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลู น้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียด ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์

ยีสต์	MIC _a		MIC _c		FIC		FICI	การแปลผลค่า FICI
	MIC _{a1}	MIC _{a2}	MIC _{c1}	MIC _{c2}	FIC ₁	FIC ₂		
น้ำมันอบเชย (1) + น้ำมันกานพลู (2)								
<i>Candida albicans</i>	0.5	1	0.25	0.5	0.5	0.5	1	no effect
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0.5	1	0.25	0.25	0.5	0.25	0.75	partial synergism
<i>Pichia membranaefaciens</i>	0.5	1	0.25	0.5	0.5	0.5	1	no effect
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0.5	1	0.25	0.5	0.5	0.5	1	no effect
น้ำมันอบเชย (1) + น้ำมันว่านเต่าเกียด (2)								
<i>Candida albicans</i>	0.5	1	0.125	0.5	0.25	0.5	0.75	partial synergism
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0.5	1	0.03	0.5	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Pichia membranaefaciens</i>	0.5	1	0.125	0.06	0.25	0.06	0.31	synergism
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0.5	1	0.03	0.5	0.06	0.5	0.56	partial synergism
น้ำมันกานพลู (1) + น้ำมันว่านเต่าเกียด (2)								
<i>Candida albicans</i>	1	1	0.25	0.5	0.25	0.5	0.75	partial synergism
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1	1	0.06	0.5	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Pichia membranaefaciens</i>	1	1	0.5	0.25	0.5	0.25	0.75	partial synergism
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1	1	0.06	0.25	0.06	0.25	0.31	synergism

MIC_{a1} หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันชนิดที่ 1 เพียงชนิดเดียว และ MIC_{a2} หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันชนิดที่ 2 เพียงชนิดเดียว

MIC_{c1} หมายถึงค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม และ MIC_{c2} หมายถึงค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม

FIC₁ คำนวณได้จากค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_{c1}) หารด้วยค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เพียงชนิดเดียว (MIC_{a1})

FIC₂ คำนวณได้จากค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_{c2}) หารด้วยค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เพียงชนิดเดียว (MIC_{a2})

FICI หมายถึงผลรวมของ FIC₁ (FIC ของน้ำมันชนิดที่ 1) กับ FIC₂ (FIC ของน้ำมันชนิดที่ 2)

FICI น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 หมายถึงเสริมฤทธิ์กัน มากกว่า 0.5 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.75 หมายถึงเสริมฤทธิ์กันบางส่วน มากกว่า 0.75 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 หมายถึงไม่มีผล และมากกว่า 2 หมายถึงเป็นปฏิปักษ์กัน

4.3 สมบัติทางพฤกษเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย

4.3.1 การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

4.3.1.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay)

ในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 9 ชนิด พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด (ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งมีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน BHT (ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ α -tocopherol (IC_{50} เท่ากับ 0.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูงได้แก่ น้ำมันข่า น้ำมันโกฐเชียง และน้ำมันว่านนางคำ (ค่า IC_{50} เท่ากับ 1.25, 1.65 และ 1.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) และน้ำมันที่มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่ไม่สูงมากนักได้แก่ น้ำมันโกฐจุฬาฬัมพา น้ำมันเปราะหอม น้ำมันว่านเต่าเกียด น้ำมันว่านน้ำและน้ำมันอบเชย (ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.23, 8.15, 10.56, 11.80 และ 14.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) (ตารางที่ 4.3)

4.3.1.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay)

จากการศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของการน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร โดยทำการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยทั้งหมด 9 ชนิดด้วยวิธี FRAP method ซึ่งเป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในน้ำมันหอมระเหย สามารถอธิบายได้ว่า สารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในน้ำมันหอมระเหยนั้น จะรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์ริก $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ให้เปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ อะตอมของเหล็กในสาร $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ จะถูกรีดิวซ์ให้เป็น $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ จึงทำให้เกิดเป็นสีน้ำเงินเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือแอสคอร์บิก-โทโคเฟอรอล นั้นแสดงให้เห็นว่าหากค่าความสามารถในการรีดิวซ์ยิ่งสูงกิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยก็จะยิ่งมากเช่นกัน จากการวิเคราะห์พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ได้ดีที่สุด ได้แก่ น้ำมันกานพลู และน้ำมันว่านน้ำ ซึ่งมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์ที่ 3.69 และ 1.19 มิลลิโมลของเหล็กเฟอร์รัสต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย (ตารางที่ 4.3) น้ำมันหอมระเหยที่มีความสามารถในการรีดิวซ์สูงรองลงมาคือ น้ำมันข่า และน้ำมันว่านนางคำ โดยมีความสามารถในการรีดิวซ์ที่ 0.38 และ 0.30 มิลลิโมลของเหล็กเฟอร์รัสต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหยตามลำดับ รองลงมาคือ น้ำมันโกฐเชียง และน้ำมันเปราะหอม โดยมีความสามารถในการรีดิวซ์ที่ 0.26 และ 0.13 มิลลิโมลของเหล็กเฟอร์รัสต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหยตามลำดับ และน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรชนิดอื่นๆ ได้แก่ น้ำมันอบเชย น้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันโกฐจุฬาฬัมพา มีความสามารถในการรีดิวซ์ที่ต่ำกว่า 0.10 มิลลิโมลของเหล็กเฟอร์รัสต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย โดยมีค่าการรีดิวซ์ดังนี้ 0.08, 0.07 และ 0.01 มิลลิโมลของ

เหล็กเพอร์สต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหยตามลำดับ สำหรับสารมาตรฐานที่ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวกคือ แอลฟา-โทโคเฟอรอลซึ่งเป็นสารที่มีสมบัติในการรีดิวซ์ได้ต่ำกว่าสมบัติการรีดิวซ์ของน้ำมันกานพลู โดยมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์เท่ากับ 0.15 มิลลิโมลของเหล็กเพอร์สต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย แต่สารมาตรฐานแอลฟา-โทโคเฟอรอลมีกิจกรรมการรีดิวซ์ที่รองจากน้ำมันเปราะหอม น้ำมันอบเชย น้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันโกฐจุฬาลัมพาที่มีค่าความสามารถในการรีดิวซ์เท่ากับ 0.13, 0.08, 0.07 และ 0.01 มิลลิโมลของเหล็กเพอร์สต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหยตามลำดับ

4.3.1.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay)

จากการวิเคราะห์หากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยทั้งหมด 9 ชนิด โดยวิธี ABTS assay เปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิก (positive control) พบว่าน้ำมันกานพลูมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ ได้ดีที่สุดมีค่าเท่ากับ 998.62 มิลลิกรัมของโทรล็อกซ์ต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ ได้ดีใกล้เคียงกับกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ ของกรดแอสคอร์บิก (994.90 มิลลิกรัมของโทรล็อกซ์ต่อกรัมของกรดแอสคอร์บิก) และน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ ได้ค่อนข้างสูงคือ น้ำมันว่านนางคำ และน้ำมันข่า (254.91 และ 184.82 มิลลิกรัมของโทรล็อกซ์ต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย ตามลำดับ) ส่วนน้ำมันโกฐเชียง น้ำมันโกฐจุฬาลัมพา น้ำมันเปราะหอม น้ำมันว่านเต่าเกียด น้ำมันว่านน้ำ และน้ำมันอบเชยมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ ไม่สูงมากนัก (254.91, 184.82, 94.20, 90.72, 86.51, 44.67, 42.95 และ 33.77 มิลลิกรัมของโทรล็อกซ์ต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย ตามลำดับ) (ตารางที่ 4.3)

ผลการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 วิธี คือ DPPH, FRAP และ ABTS ให้ผลสอดคล้องกันเฉพาะน้ำมันกานพลูเท่านั้นคือน้ำมันกานพลูมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดส่วนน้ำมันชนิดอื่นแม้จะให้ค่าผันแปรระหว่าง 3 วิธี แต่มีแนวโน้มของกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระได้ดีได้แก่ น้ำมันข่า น้ำมันว่านนางคำ และน้ำมันโกฐจุฬาลัมพา กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างดีได้แก่น้ำมันเปราะหอม น้ำมันว่านเต่าเกียด น้ำมันว่านน้ำ และน้ำมันอบเชย ส่วนน้ำมันโกฐเชียงให้ค่าผันแปรระหว่าง 3 วิธี มากที่สุดแต่มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระได้ดีรองจากน้ำมันข่าโดยวิธี DPPH กับ วิธี ABTS และมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระได้ดีรองจากน้ำมันว่านนางคำโดยวิธี FRAP (ตารางที่ 4.3)

4.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของน้ำมันหอมระเหย

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยทั้งหมด 9 ชนิด พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดได้แก่น้ำมันกานพลู (889.17 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่มีปริมาณค่อนข้างสูงใกล้เคียงกันคือน้ำมันเปราะหอม และน้ำมัน

อบเชย (777.96 และ 670.70 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย ตามลำดับ) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่มีปริมาณปานกลางคือ น้ำมันโกลูจุฟาลัมพา น้ำมันข่า และน้ำมันโกฐเชียง (480.10, 442.14 และ 380.92 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย ตามลำดับ) และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่มีปริมาณค่อนข้างน้อยคือ น้ำมันว่านนางคำ น้ำมันว่านน้ำ และน้ำมันว่านเต่าเกียด (240.00, 229.27, และ 155.51 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหยตามลำดับ) (ตารางที่ 4.3)

4.3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของน้ำมันหอมระเหย

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรทั้งหมด 9 ชนิด (ตารางที่ 4.5) พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด คือ น้ำมันกานพลู โดยมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 141.91 มิลลิกรัมของคาเทชินต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่มากรองลงมา ได้แก่ น้ำมันว่านนางคำ และน้ำมันข่า ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 96.55 และ 11.86 มิลลิกรัมของคาเทชินต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหยตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยอบเชย น้ำมันโกลูจุฟาลัมพา น้ำมันว่านน้ำ น้ำมันโกฐเชียง น้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันเปราะหอมมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดน้อยกว่า 10 มิลลิกรัมของคาเทชินต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย (9.87, 8.05, 5.79, 5.60, 4.24 และ 2.14 มิลลิกรัมของคาเทชินต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหยตามลำดับ) สำหรับสารมาตรฐานที่ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวกคือ แอลฟา-โทโคเฟอรอลซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ 0.15 มิลลิกรัมของคาเทชินต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย โดยจะพบว่าน้ำมันหอมระเหยเปราะหอม น้ำมันอบเชย น้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันโกลูจุฟาลัมพามีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดต่ำกว่าสารมาตรฐานแอลฟา-โทโคเฟอรอล

เมื่อพิจารณากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจะเห็นได้ว่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันกานพลูสูงที่สุด สัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของน้ำมันกานพลูที่สูงที่สุดด้วย ส่วนกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่ให้ผลสอดคล้องกัน (ลำดับความมากน้อยเหมือนกัน) อย่างน้อย 2 วิธีการ (วิธี DPPH และวิธี ABTS) คือน้ำมันโกลูจุฟาลัมพา (ลำดับที่ 4) น้ำมันเปราะหอม (ลำดับที่ 5) น้ำมันว่านเต่าเกียด (ลำดับที่ 6) น้ำมันว่านน้ำ (ลำดับที่ 7) และน้ำมันอบเชย (ลำดับที่ 8) และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดพบว่านอกจากน้ำมันกานพลูแล้วพบว่ายังมีน้ำมันว่านน้ำที่กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและถ้าพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดพบว่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS) ของน้ำมันว่านนางคำ น้ำมันข่า และน้ำมันโกลูจุฟาลัมพามีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ตารางที่ 4.3)

จากการทดลองนี้น้ำมันว่านน้ำมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระได้ค่อนข้างน้อยซึ่งต่างจากงานวิจัยของ Shukla และคณะ (2013) ได้รายงานน้ำมันว่านน้ำ (*Acorus calamus*) มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระได้ดี (IC_{50} เท่ากับ 1.06 ไมโครลิตรต่อมิลลิกรัม) นอกจากนี้ Senthikumar และ Venkatesalu (2012) ได้รายงานสารสำคัญจากเหง้าของน้ำมันว่านน้ำโดยใช้วิธี Gas Chromatography (GC) และ Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS) พบว่ามีสารประกอบ 20 ชนิด โดยมีสารประกอบหลักได้แก่ beta-asarone (ร้อยละ 33.36), *cis*-beta-terpineol (ร้อยละ 23.44), limonene (ร้อยละ 13.08), carvone (ร้อยละ 5.64), amyl isovalerate (ร้อยละ 4.92), globulol (ร้อยละ 3.28), beta-copaene (ร้อยละ 2.53), linalool (ร้อยละ 2.48), octyl acetate (ร้อยละ 2.30) และสารประกอบอื่นๆ ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 2

จากการทดลองนี้พบว่าน้ำมันชาที่ได้จากเหง้ามีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูงโดยมีรายงานการวิจัยสนับสนุนกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันชาได้ดี เช่น Zaeoung และคณะ (2005) พบว่าน้ำมันชา (*Alpinia galanga*) มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่ค่า EC_{50} เท่ากับ 2.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม โดยวิธี DPPH แต่ Tachakittirungrod และ Chowwanapoonpohn (2007) ได้รายงานน้ำมันชาที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 550 ไมโครต่อมิลลิกรัม โดยวิธี DPPH ส่วน Mahae และ Chaiseri (2009) ได้รายงานกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันไ้วว่ามีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 431.69 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม โดยวิธี DPPH ซึ่งยังได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดพบว่ามีปริมาณเท่ากับ 5.01 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำมัน และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดพบว่ามีปริมาณเท่ากับ 0.20 มิลลิกรัมของคาเทชินต่อกรัมของน้ำมัน นอกจากนี้ Wu และคณะ (2014) ได้ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีจากเหง้าของน้ำมันชาโดยวิธี gas chromatography coupled to flame ionization detector (GC-FID) และวิธี gas chromatography coupled to spectrometry (GC-MS) พบว่ามีสารประกอบทั้งหมด 51 ชนิด โดยมีสารสำคัญได้แก่ eucalyptol (peak area ร้อยละ 22.63), (1S)-(1)- β -pinene (peak area ร้อยละ 14.36), 1R- α -Pinene (peak area ร้อยละ 10.89), α -terpineol (peak area ร้อยละ 8.59), L(-)-borneol (peak area ร้อยละ 8.41), (-)-camphor (peak area ร้อยละ 4.21), camphene (peak area ร้อยละ 4.14), 2,4(8)-*p*-Menthadiene (peak area ร้อยละ 2.14) และ (*Z*)-geraniol (peak area ร้อยละ 2.13)

จากการทดลองนี้ น้ำมันโกฎิเชียงมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างดี จากงานวิจัยของ Li และคณะ (2007) ได้รายงานงานกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันโกฎิเชียง (*Angelica sinensis*) ด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 194.7 และ 98.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ได้มีการศึกษาสารสำคัญในน้ำมันจากรากของโกฎิเชียงพบว่ามีสารประกอบในกลุ่ม alkyl phthalides ได้แก่ ligustilide, (*Z*)-ligustilide, (*Z*)-6,7-epoxyligustilide, angelicide, (*Z*)-butylidenephthalide, butylphthalide และ 2,4-dihydrophthalic anhydride สารประกอบในกลุ่ม terpenes ได้แก่ β -cadinene, carvacrol และ *cis*- β -ocimene (Zhang, 2003)

จากการทดลองน้ำมันโกฎจุฬาลัมพามีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระได้ค่อนข้างดีสอดคล้องกับ รายงานวิจัยของ Radulović และคณะ (2013) พบว่าน้ำมันโกฎจุฬาลัมพา (*Artemisia annua* L.) มี กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระได้ดีโดยได้ทำการศึกษากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH แสดงค่า EC_{50} เท่ากับ 2.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวิธี ABTS แสดงค่า EC_{50} เท่ากับ 0.640 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร นอกจากนี้ Ćavar และคณะ (2012) ได้รายงานกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันโกฎ จุฬาลัมพาโดยวิธี DPPH แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 27.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวิธี ABTS แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 5.97 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ Ćavar และคณะ (2012) ได้ทำการวิเคราะห์หา องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันโกฎจุฬาลัมพพบว่ามีองค์ประกอบหลักที่สำคัญได้แก่ artemisia ketone (ร้อยละ 30.7), camphor (ร้อยละ 15.8), artemisia alcohol (ร้อยละ 6.5), 1,8-cineole (ร้อยละ 4.8), caryophyllene oxide (ร้อยละ 3.9), *cis*-isolongifolanone (ร้อยละ 2.3), yomogi alcohol (ร้อยละ 2.1) และองค์ประกอบอื่นๆ ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 2 ยังมีรายงานสนับสนุน กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันโกฎจุฬาลัมพาที่ได้จากสถานที่ที่แตกต่างกันบนหมู่เกาะมาเดไยรา (Madeira) ได้แก่ Preces, Jardim Botanico และ Porto Santo พบว่ามีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH เท่ากับ 7.71-10.9 ไมโครโมลของTroloxต่อมิลลิลิตรของน้ำมัน วิธี ABTS เท่ากับ 25.9-38.1 ไมโครโมลของTroloxต่อมิลลิลิตรของน้ำมัน และวิธี FRAP เท่ากับ 1.06-1.28 มิลลิโม ลของ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ต่อมิลลิลิตรของน้ำมัน อย่างไรก็ตามกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันเมื่อ เปรียบเทียบกับสารสกัด (อะซีโตน, เมทานอล) ของโกฎจุฬาลัมพพบว่าสารสกัดมีกิจกรรมต้านอนุมูล อิสระได้ดีกว่าน้ำมันโกฎจุฬาลัม นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกของโกฎจุฬาลัมพจากทั้ง 3 สถานที่มี ปริมาณในช่วง 331.0-521.2 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม ของสารสกัด (Gouveia และ Castilho, 2013) นอกจากนี้ Bilia และคณะ (2006) รายงานว่าโกฎจุฬาลัมพาที่สกัดด้วย hexane และ dichloromethane มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในช่วงร้อยละ 0.50-2.82 กิจกรรมต้าน อนุมูลอิสระอาจเป็นผลมาจากสารประกอบในน้ำมันโกฎจุฬาลัมพามีรายงานการนำสารบริสุทธิ์ของ artemisia ketone ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในน้ำมันโกฎจุฬาลัมพามาทดสอบพบว่ามีการ การต้านอนุมูลอิสระได้ดีโดยแสดงค่า EC_{50} เท่ากับ 4.00 และ 1.79 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี DPPH และวิธี ABTS ตามลำดับ (Radulović และคณะ, 2013)

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้อนุมูลอิสระ DPPH ของน้ำมันอบเชยพบว่าแสดง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับ BHT ซึ่งสอดคล้องกับผลรายงานการวิจัยของนักวิจัย หลายท่าน เช่น Singh และคณะ (2007) ได้รายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของน้ำมันอบเชย (cinnamon bark oil) และ BHT ที่ความเข้มข้น 5-25 ไมโครลิตร พบว่าน้ำมันอบเชยมีการ การต้านอนุมูลของ DPPH เท่ากับร้อยละ 71.1-83.6 และ BHT มีกิจกรรมการต้านอนุมูลของ DPPH เท่ากับร้อยละ 81.2-94.9 แต่ Nanasombat และ Wimuttigosol (2011) ได้รายงานว่าน้ำมันอบเชย มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงโดยมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูล DPPH ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.29 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตรโดยวิธี DPPH และมีค่าความสามารถในการ reducing capacity เท่ากับ 2.19 มิลลิโมลต่อ

มิลลิกรัม โดยวิธี FRAP นอกจากนี้ น้ำมันอบเชยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 140.9 ไมโครกรัมของแกลลิกตอกรัมของน้ำมัน ส่วน Hector และ Simon (2004) รายงานว่าน้ำมันอบเชยสามารถยับยั้งอนุมูล ABTS^{•+} ได้เท่ากับ 22.9 มิลลิกรัมของโทร็อกซ์ต่อมิลลิลิตรของน้ำมัน โดยวิธี ABTS ขณะที่ Aazza และคณะ (2011) ได้รายงานว่าน้ำมันอบเชยให้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 217.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยวิธี ABTS นอกจากนี้ Singh และ Lawrence (2015) ได้ศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันอบเชยโดยวิธี FRAP พบว่าน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้น 0.1, 0.4 และ 1 มิลลิโมลลาร์ สามารถ reducing power ได้เท่ากับ 0.62, 1.59 และ 2.14 มิลลิโมลลาร์ Fe²⁺ ต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงมากเท่ากับ 0.375 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตรของน้ำมัน ส่วน Politeo และคณะ (2006) ได้รายงานกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูล DPPH เท่ากับร้อยละ 6, 7, 9 และ 14 ตามลำดับ และมีความสามารถในการ reducing power ได้น้อยกว่า 1 มิลลิโมลต่อลิตร

จากการทดลองนี้ น้ำมันว่านนางคำที่ได้จากเหง้ามีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระได้ดีโดยมีรายงานการวิจัยแสดงให้เห็นกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันว่านนางคำ เช่น Shahwar และคณะ (2012) ได้รายงานว่าน้ำมันว่านนางคำ (*Curcuma aromatica*) มีความสามารถในการรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 130.6 ไมโครโมล โดยวิธี FRAP และ Angel และคณะ (2012) ได้รายงานว่าน้ำมันว่านนางคำมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระได้ดีโดยสามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ที่ค่า IC₅₀ เท่ากับ 3.9 ไมโครลิตร และพบว่ามีสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 7.5 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อไมโครลิตรของน้ำมัน และ Tsai และคณะ (2011) ได้รายงานกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันว่านนางคำที่ค่า EC₅₀ เท่ากับ 19.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี DPPH รวมถึง Angel และคณะ (2014) ได้รายงานการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีจากเหง้าของน้ำมันว่านนางคำด้วยวิธี GC-MS พบว่ามีสารสำคัญได้แก่ camphor (peak area ร้อยละ 18.8), camphene (peak area ร้อยละ 10.2), 1,8 cineole (peak area ร้อยละ 10.1), borneol (peak area ร้อยละ 8.2), β -elemene (peak area ร้อยละ 7.5), curdione (peak area ร้อยละ 4.8), xanthorhizol (peak area ร้อยละ 4.8), neo-curdione (peak area ร้อยละ 3.2) และ germacrene-B (peak area ร้อยละ 2.8) และยังมีสารประกอบอื่นๆ อีกหลายชนิดแต่พบในปริมาณที่น้อย

จากการทดลองนี้ น้ำมันว่านเต่าเกียดมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดค่อนข้างน้อยซึ่งต่างกับการรายงานของ Barua และคณะ (2014) ซึ่งได้พบว่าสารสกัดว่านเต่าเกียด (*Homalomena aromatica*) ที่ได้จากรากมีกิจกรรม DPPH[•] radical-scavenging เท่ากับร้อยละ 79.9 และค่า EC₅₀ เท่ากับ 1.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการวิเคราะห์หากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP พบว่าสารสกัดจากว่านเต่าเกียดที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการรีดิวซ์เท่ากับร้อยละ 322.3 และการหากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS พบว่าสารสกัดจากว่านเต่าเกียดให้ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของ ABTS เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 5.79 ถึงร้อยละ 14.81 ที่ความเข้มข้น 1-9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากว่านเต่าเกียดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ทั้งหมดเท่ากับ 9.00×10^{-3} มิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมของสารสกัด และมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 7.00×10^{-3} มิลลิกรัมของควอซิทินต่อกรัมของสารสกัด (Barua และคณะ, 2014)

จากผลการทดลองนี้ น้ำมันเปราะหอมมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างดี ซึ่งได้มีรายงานการศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันเปราะหอม (*Kaempferia galanga* L.) ที่ได้จากเหง้าโดย Sahoo และคณะ (2014) พบว่าน้ำมันเปราะหอมมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี DPPH และมีรายงานของ Fan และคณะ (2015) ได้ศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของน้ำมันเปราะหอมที่ได้จากการสกัดโดยวิธีที่แตกต่างกันคือ Steam distillation (SD), Subcritical water extraction (SWE) และ Ultrasound-enhanced subcritical water extraction (USWE) พบว่าแสดงค่าการยับยั้งอนุมูล DPPH เท่ากับ ร้อยละ 52.7 ร้อยละ 86.8 และร้อยละ 91.9 ตามลำดับ การที่น้ำมันเปราะหอมมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูงน่าจะเป็นเพราะสารประกอบในน้ำมันเปราะหอม Sahoo และคณะ (2014) ได้จำแนกชนิดของสารประกอบในน้ำมันเปราะหอมด้วยวิธี GC-MS พบว่าประกอบด้วย ethyl p-methoxy cinnamate (peak area ร้อยละ 82.01), ethyl cinnamate (peak area ร้อยละ 9.69), 3-carene (peak area ร้อยละ 3.41), eucalyptol (peak area ร้อยละ 1.60), borneol (peak area ร้อยละ 0.62) และ pentadecane (peak area ร้อยละ 0.57)

จากการทดลองน้ำมันกานพลูมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้มากที่สุดและมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุดเช่นเดียวกัน สอดคล้องกับรายงานการวิจัยหลายท่าน เช่น Hector และคณะ (2004) ซึ่งได้รายงานว่าน้ำมันกานพลู (*Syzygium aromaticum*) มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันจากสมุนไพรชนิดอื่นโดยพบว่าน้ำมันกานพลูมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงคือ 601.1 มิลลิกรัมของโทรลลอคซ์ต่อมิลลิลิตรของน้ำมัน โดยวิธี ABTS ขณะที่ Singh และ Lawrence (2015) ได้รายงานว่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันกานพลูเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นโดยน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 0.1, 0.4 และ 1 มิลลิโมลลาร์ มีความสามารถในการรีดิวซ์เท่ากับ 0.82, 1.59 และ 2.14 มิลลิโมลลาร์ Fe^{2+} ต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.75 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตรของน้ำมัน ซึ่งสูงกว่าน้ำมันจากพืชชนิดอื่นที่ทดสอบ นอกจากนี้ Politeo และคณะ (2006) ได้มีรายงานกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าให้ค่า % DPPH inhibition เท่ากับ 93, 93, 93 และ 94 ตามลำดับ โดยวิธี DPPH และแสดงความสามารถในการ reducing power ได้เท่ากับ 88, 131, 440 และ 740 มิลลิโมลต่อลิตร ตามลำดับ การมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงอาจสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบชนิดอื่นในน้ำมันกานพลูดังจะเห็นได้จากผลการวิเคราะห์ของ Hector และคณะ (2004) ซึ่งได้วิเคราะห์หาสารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันกานพลูพบสารสำคัญที่เป็นสารประกอบหลักได้แก่ eugenol ร้อยละ 74.7 และ eugenyl acetate ร้อยละ 15.8 แต่ Aazza และคณะ (2011) ได้วิเคราะห์หาสารประกอบหลักด้วยวิธี GC-MS พบว่าน้ำมันกานพลูประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิดโดยสารประกอบหลักที่พบคือ eugenol ร้อยละ 80.8, p-cymene ร้อยละ 8.7, trans-p-2-menthen-1-ol ร้อยละ 6.7 ส่วนสารชนิดอื่นๆ พบในปริมาณที่น้อย Cortés-Rojas และคณะ (2014) ได้กล่าวว่ากานพลูมีสารประกอบโพลีฟีนอลและสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณมาก และกานพลูยังมีประสิทธิภาพอย่างมากในการใช้เป็นสารกันบูดในอาหาร

ตารางที่ 4.3 สมบัติทางพฤกษเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย	Antioxidant activity			Total Phenolic content	Total Flavonoid content
		DPPH IC ₅₀ (mg/ml) ± SD	FRAP (mmol Fe (II)/g essential oil) ± SD	ABTS (mg Trolox/g essential oil) ± SD	(mg GAE/g essential oil) ± SD	(mg คาเทชิน/g essential oil) ± SD
<i>Acorus calamus</i> Linn.	ว่านน้ำ	^a 11.80 ± 0.88	1.19 ± 0.03	42.95 ± 2.06	229.27 ± 3092	5.79 ± 0.83
<i>Alpinia galanga</i> (Linn.) Willd.	ข่า	1.25 ± 0.04	0.38 ± 0.02	184.82 ± 3.88	442.14 ± 5.45	11.86 ± 0.73
<i>Angelica sinensis</i> (Oliv.) Diels.	โกฐเชียง	1.65 ± 0.02	0.26 ± 0.03	94.20 ± 1.70	380.92 ± 4.95	5.60 ± 0.39
<i>Artemisia annua</i> Linn.	โกฐจุฬาลัมพา	2.23 ± 0.03	0.01 ± 0.01	90.72 ± 1.85	480.10 ± 0.35	8.05 ± 0.62
<i>Cinnamomum verum</i> J.Pres.	อบเชย	14.72 ± 2.76	0.08 ± 0.02	33.77 ± 0.90	670.70 ± 2.02	9.87 ± 0.83
<i>Curcuma aromatica</i> Salisb.	ว่านนางคำ	1.68 ± 0.04	0.30 ± 0.03	254.91 ± 2.87	240.00 ± 6.88	96.55 ± 3.06
<i>Homalomena aromatica</i> Schott.	ว่านเต่าเกียด	10.56 ± 5.64	0.07 ± 0.01	44.67 ± 1.03	155.51 ± 6.94	4.24 ± 1.90
<i>Kaempferia galanga</i> Linn.	เปราะหอม	8.15 ± 0.28	0.13 ± 0.01	86.51 ± 3.63	777.96 ± 2.89	2.14 ± 0.19
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr.&Perry.	กานพลู	0.58 ± 0.01	3.69 ± 0.06	998.62 ± 2.90	889.17 ± 4.75	141.91 ± 0.79
กรดแอสคอร์บิก		-	^b -	994.90 ± 2.21	-	-
α-tocopherol		0.41 ± 0.00	0.15 ± 0.02	-	-	-
BHT		0.39 ± 0.01	-	-	-	-

^a ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ; ^b ไม่ได้ทำการทดลอง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 20 ชนิด ยีสต์ 8 ชนิด และสมบัติทางพิษเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยทั้ง 9 ชนิด พบว่าน้ำมันว่านน้ำ น้ำมันอบเชย น้ำมันว่านเต่าเกียด น้ำมันเปราะหอม และน้ำมันกานพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้ ในขณะที่น้ำมันข่า น้ำมันโกฐเชียง น้ำมันโกฐจุฬาล้มพา และน้ำมันว่านนางคำมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ที่ต่ำ เมื่อพิจารณาจากค่า MIC พบว่าน้ำมันอบเชยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด และน้ำมันว่านน้ำพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ดีที่สุดโดยเฉพาะเชื้อ *Candida lipolytica* และ *Hanseniaspora uvarum* มีค่า MIC เท่ากับ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำน้ำมันอบเชย น้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันกานพลูมาผสมกันเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์พบว่าคุณสมบัติของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลู คุณสมบัติของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และคุณสมบัติของน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียดแสดงปฏิสัมพันธ์ที่เสริมฤทธิ์กันบางส่วน (FICI มากกว่า 0.5 แต่น้อยกว่า หรือเท่ากับ 0.75) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ส่วนคุณสมบัติของน้ำมันน้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และคุณสมบัติของน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียดแสดงปฏิสัมพันธ์ที่เสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *Pichia membranaefaciens* และ *Rhodotorula glutinis* ตามลำดับ (FICI น้อยกว่า 0.5)

จากการศึกษาสมบัติทางพิษเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยทั้ง 9 ชนิด พบว่าน้ำมันกานพลูมีความสามารถต้านออกซิเดชันทำลายฤทธิ์ของอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดเนื่องจากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50% โดยให้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH น้อยกว่า positive control เล็กน้อย (α -tocopherol มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ BHT มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่าทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{2+}$ ได้มากที่สุดมีค่าเท่ากับ 3.69 มิลลิโมล Fe (II) ต่อกรัม น้ำมันหอมระเหย และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP สูงกว่า positive control (α -tocopherol มีค่าเท่ากับ 0.15 มิลลิโมล Fe (II) ต่อกรัม α -tocopherol) และการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่ามีค่าของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} เท่ากับ 998.62 มิลลิกรัมโทรล็อกซ์ต่อกรัม น้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS สูงกว่า positive control (กรดแอสคอร์บิกมีค่าเท่ากับ 0.15 มิลลิกรัมโทรล็อกซ์ต่อกรัมกรดแอสคอร์บิก)

นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (มีค่าเท่ากับ 889.14 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัม น้ำมันหอมระเหย) และสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงที่สุด (มีค่าเท่ากับ 141.91 มิลลิกรัมคาเทชินต่อกรัม น้ำมันหอมระเหย) จึงสามารถบอกได้ว่าสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยหากน้ำมันหอมระเหยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่สูงก็จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงเช่นกัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองนี้มีข้อเสนอแนะในการนำน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทยสามารถที่มีกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียมาประยุกต์ใช้สำหรับความปลอดภัยในอาหารและบรรจุภัณฑ์ได้ซึ่งน้ำมันหอมระเหยได้ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญในอาหารหลายชนิดโดยสามารถนำมาใช้เป็นสารกันบูดทางธรรมชาติได้ โดยเฉพาะเชื้อราและที่ทำให้อาหารและผลไม้เน่าเสีย นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มกลิ่นรสให้กับอาหารเพื่อเพิ่มความน่ารับประทานเช่น เค้กที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย น้ำมันหอมระเหยจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับนำมาใช้ในการถนอมอาหารได้ในอนาคตโดยเน้นการนำไปใช้เพื่อการถนอมอาหารในผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับกลุ่มผู้บริโภคที่ให้ความสำคัญกับสุขภาพ จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความไวต่อน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ ไม่เท่ากัน ซึ่งน้ำมันหอมระเหยบางชนิดมีฤทธิ์ต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งได้ดีแต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ โดยส่วนใหญ่เชื้อราที่สามารถสร้างสารพิษในอาหารได้ เช่นเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่มักพบในขนมปังและธัญพืช สารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราและยีสต์รวมทั้งสปอร์ของเชื้อราในอาหารได้ เช่น สาร cinnamaldehyde ในน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยซึ่งมีหมู่ benzyl และ aldehyde (Chang และคณะ, 2001) และสาร eugenol ในน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ในเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Burt, 2004) ในส่วนของยีสต์ที่ทำให้อาหารเสียเช่น *Debaryomyces hansenii* ใน nougats ผลไม้ (ขนมถั่วตัดคล้ายตังเม) *Pichi membranaefaciens* ในน้ำแอปเปิ้ลและอาหารแช่แข็ง และ *Zygosaccharomyces rouxii* ในน้ำแอปเปิ้ล เป็นต้น (Matan และคณะ, 2006; Cerrutti และ Alzamora, 1996) วิธีการนำน้ำมันหอมระเหยไปใช้ในการถนอมอาหารอาจทำได้โดยการจุ่มและพ่นใช้ในการเก็บรักษาผลไม้ต่างๆ ไว้ได้นานขึ้น เช่น การใช้ cinnamaldehyde จากน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยมาพ่นลงในผลไม้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้ (Sivakumar และคณะ, 2002) วิธีการจุ่มและพ่นน้ำมันหอมระเหยในอาหารโดยตรงมีข้อเสียคือกลิ่นรสของน้ำมันหอมระเหยอาจทำให้วัตถุดิบและผลไม้เหล่านั้นเสียรสชาติ ดังนั้นจึงต้องมีการเลือกใช้วิธีนี้กับผลไม้ที่ต้องแกะเปลือกออกก่อนที่จะรับประทานหรือใช้น้ำมันหอมระเหยกับวัตถุดิบที่ต้องทำการปรุงด้วยความร้อนอีกครั้งเพื่อกำจัดกลิ่นของน้ำมันหอมระเหยก่อนที่จะนำมารับประทาน เพื่อลดกลิ่นรสคั่งค้างของน้ำมันหอมระเหย แต่ในการผสมน้ำมันหอมระเหยในอาหารโดยตรงที่ผ่านการปรุงสุกนั้นก็ยังสามารถทำได้โดยต้องเลือกผลิตภัณฑ์อาหารที่เข้ากับกลิ่นรสของน้ำมันหอมระเหยชนิดนั้นๆ และน้ำมันหอมระเหยชนิดนั้นต้องมีความเข้มข้นมากพอที่จะยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

ในอาหารได้ หรือการใช้น้ำมันหอมระเหยมาเคลือบลงในฟิล์มที่บริโภคเพื่อช่วยชะลอการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์อาหารได้ และวิธีการดูดและการปล่อยไอของน้ำมันหอมระเหยในวัสดุดูดซับ วิธีการนี้เป็นการใช้ไอของน้ำมันหอมระเหยให้สัมผัสกับอาหารทางอ้อม เพราะอาหารบางชนิดไม่อาจผสมน้ำมันหอมระเหยลงไปได้โดยตรง เนื่องจากกลิ่นรสของน้ำมันหอมระเหยอาจไม่สัมพันธ์กับกลิ่นรสของอาหาร โดยวิธีการนี้สามารถทำได้โดยการหยดน้ำมันหอมระเหยลงในตัวดูดซับแล้วนำไปเก็บไว้ในถุงขนาดเล็ก (sachet) จากนั้นจึงนำถุงขนาดเล็กนี้ใส่เข้าไปในบรรจุภัณฑ์ที่มีฝาปิดสนิทหรือถุงพลาสติกที่เป็น high barrier bag ที่ใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร หลังจากมีการปิดผนึกภาชนะบรรจุนั้นแล้วไอของน้ำมันหอมระเหยจะระเหยออกมาสัมผัสกับผิวหน้าของอาหารจึงช่วยป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่บนผิวหน้าของอาหารได้ วิธีการนี้ยังสามารถใช้ร่วมกับการควบคุมสภาวะบรรยากาศภายในบรรจุภัณฑ์ได้อีกด้วย มีการใช้เทคนิคนี้ในการยืดอายุการเก็บรักษาองุ่น (Valero และคณะ, 2006) ประโยชน์ของน้ำมันหอมระเหยนั้นยังมีอีกมากมายแต่ข้อที่ควรระวังในการนำน้ำมันหอมระเหยมาใช้ในถนอมอาหารก็มีอยู่ด้วยเช่น น้ำมันหอมระเหยที่มีความเข้มข้นสูงอาจก่อให้เกิดการไหม้ของผิวหนังทำให้เกิดการแพ้อาหารและไอของน้ำมันหอมระเหยอาจมีความเป็นพิษแฝงอยู่ ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาหาปริมาณของน้ำมันหอมระเหยที่เหมาะสมในการนำมาใช้เพื่อถนอมอาหาร และควรนำมาใช้ให้เหมาะกับชนิดและประเภทของอาหารและคำนึงถึงการยอมรับของผู้บริโภคด้วย

เอกสารอ้างอิง

- ฐาปนี หงส์รัตนารกิจ. (2550). น้ำมันหอมระเหยและการใช้ในสุคนธบำบัด. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์วิฑูรย์การปก
- นิจศิริ เรืองรังสี และพยอม ต้นดิวัฒน์. (2534). พืชสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์
- บุษกร อุตระภักดี. (2552). จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. สงขลา: ศูนย์หนังสือมหาวิทยาลัยทักษิณ
- ปริยานุช อินทร์รอด. (2551). “ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง.” โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีวเคมี, มหาวิทยาลัยบูรพา
- พรินต์ต่อทคอม. (2557). *ว่านนางคำ สรรพคุณและประโยชน์ของว่านนางคำ 21 ข้อ !*. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <http://frynn.com/ว่านนางคำ/>. 10 พฤศจิกายน 2557
- ไมตรี สุทธจิตต์, ปกฤษฎาภักดิ์ แก้วสุริยะ, ศิริวรรณ สุทธจิตต์ และอุดมภักดิ์ ขาสสุวรรณ. (2545). แอนติออกซิแดนซ์และสารสำคัญในพืชสมุนไพรไทย. *วารสารเภสัชศาสตร์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ*. 3, 254-260.
- วันทนี สว่างอารมณ์. (2542). เอกสารคำสอนรายวิชาพืชเครื่องเทศและสมุนไพร. กรุงเทพฯ: สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
- รวารุณี ครูสง. (2538). จุลชีววิทยาในการแปรรูปอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์
- ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. (2553). *ว่านเต่าเกียด*. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://www.panmai.com/Warn/Warn_ARACEA_05.shtml. 10 พฤศจิกายน 2557
- สุดารัตน์ หอมหวล. (2553). *โกฐเชียง*. ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <http://www.thaicrudedrug.com/main.php> 10 พฤศจิกายน 2557
- โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจง จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดต์สินทอง. (2550). สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพฯ: นิวไทยมิตรการพิมพ์จำกัด.
- Aazza, S., Lyoussi, B., & Miguel, M. G. (2011). Antioxidant activity of some Moroccan hydrosols. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (30), 6688-6696.
- Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. R., & Abbaszadeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Médicale*, 24, e51-e56.
- Almajano, M. P., Carbó, R., Jiménez, J. A. L., & Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108 (1), 55-63.
- Al-Reza, S. M., Rahman, A., Sattar, M. A., Rahman, M. O., & Fida, H. M. (2010). Essential

- oil composition and antioxidant activities of *Curcuma aromatic* Salisb. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1757–1760.
- Amvam, Z. P. H., Biyiti, L., Tchoumboungang, F., Menut, C., Lamaty, G., & Bouchet, P. H., (1998). Aromatic plants of tropical Central Africa. Part xxxii. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 107-117.
- Angel, G. R., Menon, N., Vimala, B., & Nambisan, B. (2014). Essential oil composition of eight starchy *Curcuma* species. *Industrial Crops and Products*, 60, 233–238.
- Angel, G. R., Vimala, B., & Nambisan, B. (2012). Antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from nine starchy *Curcuma* species. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 4 (2), 45-47.
- Angelo, A. J. S. (1996). Lipid oxidation in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 175-224.
- Armstrong, J. S., (2006). Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays*, 28 (3), 253–260.
- Arques, J. L., Rodriguez, E., Nunez, M., & Medina, M. (2008). Inactivation of Gram-negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system. *European Food Research and Technology*, 227 (1), 77–82.
- Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21 (1), 33–42.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
- Barua, C. C., Talukdar, A., Phukan, B., Hazarika, S., Barua, A. G., & Baishya, G. (2014). Phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activity of ethanolic extract of *Homalomena aromatica* (Araceae) root. *Der Pharmacia Lettre*, 6 (1), 128-138.
- Bassolé, I. H., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17 (4). 3989-4006.
- Beckman, C. H., (2000). Phenolic-storing cells: Keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57 (3), 101–110.
- Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measuring of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239 (1), 70-76.

- Bhuiyan, MD. N. I., Begum, J., & Anwar, M. N. (2008). Essential oils of leaves and rhizomes of *Kaempferia galangal* Linn. *The Chittagong University Journal of Biosocial Science*, 3 (1-2), 65-76.
- Bilia, A. R., de Malgalhaes, P. M., Bergonzia, M. C., & Vincieri, F. F. (2006). Simultaneous analysis of artemisinin and flavonoids of several extracts of *Artemisia annua* L. obtained from a commercial sample and a selected cultivar. *Phytomedicine*, 13, 487-493.
- Bilia, A. R., Santomauro, F., Sacco, C., Bergonzi, M. C., & Donato, R. (2014). Essential oil of *Artemisia annua* L.: An extraordinary component with numerous antimicrobial properties. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1-7.
- Bin Jantan, I., Moharam, B. A. K., Santhanam, J., & Jamal, J. A. (2008). Correlation between chemical composition and antifungal activity of the essential oils of eight *Cinnamomum* species. *Pharmaceutical Biology*, 46 (6), 406-412.
- Burt, S. A., van der Zee, R., Koets, A. P., de Graaff, A. M., van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H. P., & Veldhuizen, E. J. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (14), 4484-4490.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3), 223-253.
- Burton, G. W., & Traber, M. G. (1990). Vitamin E antioxidant activity biokinetics and bioavailability. *Annual Review of Nutrition*, 10, 357-382.
- Carson, C. F., Hammer, K. A., & Riley, T. V., (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 19 (1), 50-62.
- Carson, C. J. F., & Riley, T. N. (1995). Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*, 78 (3), 264-269.
- Ćavar, S., Maksimović, M., Vidic, D., & Parić, A. (2012). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Industrial Crops and Products*, 37, 479-485.
- Cerrutti, P., & Alzamora, S. M. (1996). Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purées. *International Journal of Food Microbiology*, 29 (2-3), 379-386.
- Ceylan, E., & Fung, D. Y. C. (2004). Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 12 (1), 1-55.
- Chang, S. T., Chen, P. F., & Chang, S. C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential

- oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology : An Interdisciplinary Journal Devoted to Bioscientific Research on Indigenous Drugs*, 77 (1), 123-127.
- Cheng, S. S., Liu, J. Y., Hsui, Y. R., & Chang, S. T. (2006). Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresource Technology*, 97, 306–312.
- Collins, C. H., Lyne, P. M., & Grange, J. M. (2001). *Collins and Lyne's Microbiological methods*. New York: Oxford University Press Inc.
- Cornish, M. L. & Garbary, D. J. (2010). Antioxidant from microalgae: potential application in human health and nutrition. *Free Radical Biology and Medicine*, 25, 155-171.
- Cortés-Rojas, D. F., de Souza, C. R. F., & Oliveira, W. P. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4 (2), 90-96.
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (6), 2576-2581.
- Dastmalchi, K., Dorman, H. L. D., Laakso, I., & Hiltunun, R. (2007). Chemical composition and antioxidant activity of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 1655-1663.
- Davidson, P. M., & Naidu, A. S. (2000). Phytophenols. In A. S. Naidu (Ed.), *Natural food antimicrobial systems* (pp. 265–295). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Devi, S. A., & Ganjewala, D. (2009). Antimicrobial activity of *Acorus calamus* (L.) rhizome and leaf extract. *Acta Biologica Szegediensis*, 53 (1), 45-49.
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., & Mauriello, G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (12), 4863-4870.
- Edris, A. E., (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research: PTR*, 21 (4), 308–323.
- Filtenborg, O., Frisvad, J. C., & Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *Food Microbiology*, 33, 85-102.
- Fisher, K., & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: Is citrus the answer?. *Trends in Food Science and Technology*, 19 (3), 156–164.
- Frankel, E. N., Bosanek, C. A., Meyer, A. S., Silliman, K., & Kirk, L. L. (1998). Commercial

- grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (3), 834-838.
- Frankel, E. N. (1984). Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61, 1908-1917.
- Fung, D. Y. C., Taylor S., & Kahan, J. (1977). Effects of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Safety*, 1 (1), 39–51.
- Gayoso, C.W., Lima, E. O., Oliveira, V. T., Pereira, F. O., Souza, E. L., Lima, I. O., & Navarro, D. F. (2005). Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia caryophyllata* essential oil and eugenol. *Fitoterapia*, 76, 247– 249.
- Ghani, A. (2003). *Medicinal Plants of Bangladesh with chemical constituents and uses*. (2th ed.) Nimtali, Dhaka: Asiatic Society of Bangladesh. (Chapter 4).
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116 (4), 982–989.
- Gordon, M. H. (2001). The development of oxidative rancidity in foods. In J. Porkorný, N. Yanishlieva, & M. Gordon (Eds.), *Antioxidants in food: practical application* (pp. 7-21). New York: CRC Press.
- Gouveia, S. C., & Castilho, P. C. (2013). *Artemisia annua* L.: Essential oil and acetone extract composition and antioxidant capacity. *Industrial Crops and Products*, 45, 170–181.
- Graumann, G. H., & Holley, R. A. (2008). Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 in ripening dry fermented sausage by ground yellow mustard. *Journal of Food Protection*, 71 (3), 486-493.
- Grosso, C., Ferraro, V., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Coelho, J. A., & Palavra, A. M. (2008). Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds. *Food Chemistry*, 111 (1), 197-203.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124 (1). 91-97.
- Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (1999) . Antioxidant protection and oxygen radical signaling. In D. L. Gilbert, & C. A. Colton (Eds.), *Reactive oxygen species in biological; An interdisciplinary approach* (pp. 189-220). New York; Kluwer Academic/Plenum.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (2004). Antifungal effects of *Melaleuca*

- alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53 (6), 1081–1085.
- Hector R., J., & Simon, J. E. (2004). Malagasy aromatic plants: essential oils, antioxidant and antimicrobial activities. *Acta Horticulturae*, 629, 77-81.
- Howell, N. K. & Saeed, S. (1999). The effect of antioxidants on the production of lipid oxidation products and transfer of free radicals in oxidised lipid-protein systems. In T. K. Basu, N. J. Temple, & M. L. Garg (Eds.), *Antioxidants in Human Health and Disease* (pp. 43-54). CAB International, Oxford: UK.
- Kathirvel, A., & Sujatha, V. (2012). In vitro assessment of antioxidant and antibacterial properties of *Terminalia chebula* Retz. leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, 788-795.
- Kim, T. J., Weng, W. L., Stojanovic, J., Lu, Y., Jung, Y. S., & Silva, J. L. (2008). Antimicrobial effect of water-soluble muscadine seed extracts on *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, 71 (7), 1465-1468.
- Kinsella, J. E., Frankel, E., German, B., & Kanner, J. (1993). Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, 47, 85-89.
- Kochuthressia, K. P., Britto, S. J., Jaseentha, M. O., & Raphael, R. (2012). In vitro antimicrobial evaluation of *Kaempferia galangal* L. rhizome extract. *American Journal Biotechnology and Molecular Sciences*, 2 (1), 1-5.
- Kurtzman, C. P., & James, S. A. (2006). *Zygosaccharomyces* and related genera. In C. de W. Blackburn (Ed.), *Food spoilage microorganisms* (pp. 290-292). New York: CRC Press.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern food microbiology*. New York, USA: Science+Business Media, Inc. (Chapter 6).
- Lado, C., Then, M., Varga, I., Szőke, É., & Szentmihályi, K. (2004). Antioxidant property of volatile oils determined by the ferric reducing ability. *Zeitschrift fuer Naturforschung. Section C, Biosciences*, 59 (5-6), 354-358.
- Lai, A. K. H., Fegredo, J. A., Clarke, P. J., Martin, C. R., & Preedy, V. R. (2007). Colour in relation to total antioxidant capacity of beers assessed using the FRAP assay. *Alcohol and Alcoholism*, 42 (Suppl. 1), 55-57.
- Lambert, R. J., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91 (3), 453-462.
- Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M. E., & Gardin, F.

- (2004). Use of natural aroma compounds to improve shelf life and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Science and Technology*, 15 (3–4), 201–208.
- Lao, S. C., Li, S. P., Kan, K. K. W., Li, P., Wan, J. B., Wang, Y. T., Dong, T. T. X., & Tsim, K. W. K. (2004). Identification and quantification of 13 components in *Angelica sinensis* (Danggui) by gas chromatography–mass spectrometry coupled with pressurized liquid extraction. *Analytica Chimica Acta*, 526, 131–137.
- Lee, J. Y., Yun, B. S., & Hwang, B. K. (2004). Antifungal activity of beta-asarone from rhizomes of *Acorusgramineus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (4), 776–780.
- Li, S. -Y., Yu, Y., & Li, S. -P. (2007). Identification of antioxidants in essential oil of radix *Angelicae sinensis* using HPLC coupled with DAD-MS and ABTS-based assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (9), 3358–3362.
- Lo, K. M., & Cheung, P. C. K. (2005). Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. *Food Chemistry*, 80 (4), 533–539.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R., & Nerín, C. (2005). Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (17), 6939–6946.
- Magiatis, P., Melliou, E., Skattsounis, A. L., Chinou, I., & Mitaku, S. (1999). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. *Planta Medica*, 65 (8), 749–752.
- Mahae, N., & Chaiseri, S. (2009). Antioxidant Activities and antioxidative components in extracts of *Alpinia galangal* (L.) Sw. *Kasetsart Journal: (Natural Science)*, 43, 358–369.
- Majhenič, L., Škerget, M., & Knez, Ž. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104 (3), 1258–1268.
- Manso, S., Cacho-Nerin, F., Becerril, R., & Nerín, C. (2013). Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. *Food Control*, 30 (2), 370–378.
- Ma, Q., Fan, X. -D., Liu, X. -C., Qiu, T. -Q., & Jiang, J. -G. (2015). Ultrasound-enhanced subcritical water extraction of essential oils from *Kaempferia galangal* L. and their comparative antioxidant activities. *Separation and Purification Technology*, 150, 73–79.
- Matan, N., & Matan, N. (2007). Effect of combined cinnamon and clove oil against major moulds identified from rubberwood (*Hevea brasiliensis*). *Walailak Journal of Science and Technology*, 4 (2), 165–174.

- Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A. J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., & Parker, M. (2006). Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 180–185.
- Mendoza, L., Wilkens, M., & Urzúa, A. (1997). Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology : An Interdisciplinary Journal Devoted to Bioscientific Research on Indigenous Drugs*, 58 (2), 85-88.
- Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., dos Santos, T. C., Coube, C. S., & Leitão, S. G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research : PTR*, 15 (2), 127-130.
- Montville, T. J., & Matthews, K. (2005). *Food microbiology an introduction*. Washington, DC, USA: ASM Press, (Chapter 19).
- Naidu, A. S. (2000). Overview. In A. S. Naidu (Ed.), *Natural food antimicrobial systems* (pp. 1-16). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Nakai, V. K., Rocha, L. de O., Gonçalves, E., Fonseca, H., Ortega, E. M. M., & Corrêa B. (2008). Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. *Food Chemistry*, 106 (1), 285–290.
- Nanasombat, S., & Wimmattigol, P. (2011). Antimicrobial and antioxidant activity of spice essential oils. *Food Science and Biotechnology*, 20 (1), 45-53.
- Nguefack, J., Tamgue, O., Dongmo, J. B. L., Dakole, C. D., Leth, V., Vismer, H. F., Zollo, P. H. A., & Nkengfack, A. E. (2012). Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. *Food Control*, 23 (2), 377–383.
- Noguchi, N., Komuro, E., Niki, E., & Wilson, R. L. (1994). Action of curcumin as an antioxidant against lipid peroxidation. *Journal of Japan Oil Chemists' Society*, 43, 1045-1051.
- Oussalah, M., Caillet, S., & Lacroix, M., (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69 (5), 1046–1055.
- Pasqua, R. D., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., & Mauriello, G., (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (12), 4863–4870.

- Pekmezovic, M., Rajkovic, K., Barac, A., Senerović, L., & Arsic Arsenijevic, V. (2015). Development of kinetic model for testing antifungal effect of *Thymus vulgaris* L. and *Cinnamomum cassia* L. essential oils on *Aspergillus flavus* spores and application for optimization of synergistic effect. *Biochemical Engineering Journal*, 99, 131–137.
- Phongpaichit, S., Pujenjob, N., Rukachaisirikul, V., & Ongsakul, M. (2005). Antimicrobial activities of the crude methanol extract of *Acorus calamus* Linn. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27 (Suppl. 2), 517-523.
- Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 1454-1462.
- Pokorný, J., (2001). The use of natural antioxidants in food products of plant origin. In J. Pokorný, N. Yanishlieva, & M. Gordon (Eds.), *Antioxidants in food: practical applications* (pp. 355-372). New York: CRC Press.
- Policegoudra, R. S., Goswami, S., Aradhya, S. M., Chatterjee, S., Datta, S., Sivaswamy, R., Chattopadhyay, P., & Singh, L. (2012). Bioactive constituents of *Homalomena aromatica* essential oil and its antifungal activity against dermatophytes and yeasts. *Journal de Mycologie Médicale*, 22, 83-87.
- Politeo, O., Jukić, M., & Miloš, M. (2006). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants. *Croatica Chemica Acta*, 79 (4), 545-552.
- Polle, A., & Rennenberg, H. (1993). Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress. In L. Fowden, & T. Mansfield (Eds.), *Plant adaptation to environmental stress* (pp. 263-273). London: Chapman & Hall.
- Price, L. (2007). Chemistry of essential oils. In S. Price, & L. Price (Eds.), *Aromatherapy for health professionals*. (pp. 25-41). China: Elsevier
- Proestos, C., Boziaris, I., Kapsokefalou, S. M., & Komaitis, M. (2008). Natural antioxidant constituents from selected aromatic plants and their antimicrobial activity against selected pathogenic microorganisms. *Food Technology and Biotechnology*, 46 (2), 151–156.
- Puerta, T. (1999). Inhibition of leukocytes lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 57, 445-449.
- Que, F., Mao, L.C. & Zheng, X.J. (2007). In vitro and vivo antioxidant activities of daylily flowers and the involvement of phenolic compounds. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16, 196-203.
- Radulović, N. S., Randjelović, P. J., Stojanović, N. M., Blagojević, P. D., Stojanović-Radić,

- Z. Z., Ilić, I. R., & Djordjević, V. B. (2013). Toxic essential oils. Part II: Chemical, toxicological, pharmacological and microbiological profiles of *Artemisia annua* L. volatiles. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 37–49.
- Raina, A. P., Verma, S. K., & Abraham, Z. (2014). Volatile constituents of essential oils isolated from *Alpinia galanga* Willd. (L.) and *A. officinarum* Hance rhizomes from North East India. *Journal of Essential Oil Research*, 26 (1), 24-28.
- Raina, V. K., Srivastava, S. K., & Syamasunder, K. V. (2003). Essential oil composition of *Acorus calamus* L. from the lower region of the Himalayas. *Flavour and Fragrance Journal*, 18 (1), 18-20.
- Rajput, S. B., & Karuppaiyl, S. N. (2013). β -Asarone, an active principle of *Acorus calamus* rhizome, inhibits morphogenesis, biofilm formation and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. *Phytomedicine*, 20, 139–142.
- Ramamoorthy, P.K. & Bono, A. (2007). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology*, 2, 70-80.
- Rana, I. S., Rana, A. S., & Rajak, R. C. (2011). Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1269-1277.
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., & Rao, R., (2010). Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (12), 5062–5069.
- Razafimamonjison, G., Jahiel, M., Duclos, T., Ramanoelina, P., Fawbush, F., & Danthu, P. (2014). Bud, leaf and stem essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from Madagascar, Indonesia and Zanzibar. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 3 (3), 224-233.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Rezaee, M. B., Jaimand, K., Alinezhad, S., Saberi, R., & Yoshinari, T. (2009). Chemical composition and antiaflatoxic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food Control*, 20 (11), 1018–1024.
- Regnier, T., Combrinck, S., du Plooy, W., & Botha, B. (2010). Evaluation of *Lippia scaberrima* essential oil and some pure terpenoid constituents as postharvest mycobiocides for avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 57 (3), 176–182.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., pannala, A., yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.

- Rosato, A., Vitali, C., Laurentis, N. D., Armenise, D., & Milillo, M. A. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*, 14, 727-732.
- Saad, N. Y., Muller, C. D., & Lobstein, A., (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 28 (5), 269-279.
- Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G., & Özer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15 (7), 549–557.
- Sahoo, S., Parida, R., Singh, S., Padhy, R. N. & Nayak, S. (2014). Evaluation of yield, quality and antioxidant activity of essential oil of *in vitro* propagated *Kaempferia galanga*Linn. *Journal of Acute Disease*, 3 (2), 124-130.
- Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escoria, A., & Saura-Calixto, J. (2000). Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutrition Research*, 20, 941-953.
- Santoro, G. F., Cardoso, M. G., Guimarães, L. G. L., Mendonça, L. Z., & Soares, M. J. (2007). *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Experimental Parasitology*, 116, 283–290.
- Senthilkumar, A., & Venkatesalu, V. (2012). Larvicidal potential of *Acorus calamus* L. essential oil against filarial vector mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2 (4), 324-326.
- Serrano, M., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Guillén, F., Valero, D. (2005). The use of natural antifungal compounds improves the beneficial effect of MAP in sweet cherry storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6 (1), 115–123.
- Shah, H. U., Simpson, T. J., Alam, S., Khattak, K .F., & Perveen, S. (2010). Mould incidence and mycotoxin contamination in maize kernels from Swat Valley, North West Frontier Province of Pakistan. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (4), 1111–1116.
- Shahidi, F., & Wannasundara, P. K. J. P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 67-103.
- Shahwar, D., Raza, M. A., Bukhari, S., & Bukhari, G. (2012). Ferric reducing antioxidant power of essential oils extracted from *Eucalyptus* and *Curcuma* species. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (3), S1633-S1636.
- Shukla, R., Singh, P., Prakash, B., & Dubey, N. K. (2013). Efficacy of *Acorus calamus* L.

- essential oil as a safe plant-based antioxidant, Aflatoxin B₁ suppressor and broad spectrum antimicrobial against food-infesting fungi. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 128-135.
- Sies, H., Stahl, W. & Sundquist, A. (1992). Antioxidant functions of vitamins, vitamin E and C, beta-carotene and other carotenoids. *Annals of the New York Academy of sciences*, 368, 7-19.
- Silva, F. G., Oliveira, C. B. A., Pinto, J. E. B. P., Nascimento, V. E., Santos, S. C., Seraphin, J. C., & Ferri, P. H. (2007). Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 18 (5), 990–997.
- Simić, A., Soković, M. D., Ristić, M., Grujić-Jovanović, S., Vukojević, J., & Marin, P. D. (2004). The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research*, 18, 713–717.
- Singh, G., Kapoor, I. P. S., Singh, O. P., Rao, Y. R., Leclercq, P. A., & Klinkby, N. (2000). Studies on essential oils, Part 28: chemical composition, antifungal and insecticidal activities of rhizome volatile oil of *Homalomena aromatica* Schott. *Flavour and Fragrance Journal*, 15, 278-280.
- Singh, G., Kapoor, I. P., Singh, P., De Heluani, C. S., De Lampasona, M. P., & Catalan, C. A. (2008). Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (10), 3295-3302.
- Singh, G., Maurya, S., deLampasona, M. P., & Catalan, C. A. N. (2007). A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1650–1661.
- Singh, R., & Lawrence, R. (2015). Antioxidant activity of *Syzygium aromaticum*, *Zingiber officinale* and *Cinnamomum zeylanicum* essential oils. *International Journal of Biological and Pharmaceutical Research*, 6 (2), 161-165.
- Sinha, K. K., Sinha, A. K. & Prasad, G. (1993). The effect of clove and cinnamon oils on growth of and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Letters in Applied Microbiology*, 16 (3), 114–117.
- Sivakumar, D., Wijeratnam, R. S. W., Wijesundera, R. L. C., & Abeysekere, M. (2002). Control of postharvest diseases of rambutan using cinnamaldehyde. *Crop Protection*, 21 (9), 847-852.
- Skocibusic, M., Bezic, N., & Dunkic, V. (2006). Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Food Chemistry*, 96 (1), 20–28.

- Soliman, K. M., & Badeaa, R. I. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1669–1675.
- Soylu, E. M., Soylyu, S., & Kurt, S., (2006). Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*, 161 (2), 119–128.
- Sukatta, U., Haruthaithanasan, V., Chantarapanont, W., Dilokkunanant, U., & Suppakul, P. (2008). Antifungal activity of clove and cinnamon oil and their synergistic against postharvest decay fungi of grape *in vitro*. *Kasetsart Journal : Natural Science*, 42, 169 – 174.
- Tachakittirungrod, S., & Chowwanapoonpohn, S. (2007). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from *Hyptis suaveolens* and *Alpinia galangal* growing in northern thailand. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*, 6 (1), 31-42.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, 1199–1218.
- Tarek, N., Hassan, H. M., Abdel-Ghani, S. M. M., Radwan, I. A., Hammouda, O., & El-Gendy, A. O. (2014). Comparative chemical and antimicrobial study of nine essential oils obtained from medicinal plants growing in Egypt. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 3, 149-156.
- Tewtrakul, S., Yuenyongsawad, S., Kummee, S., & Atsawajaruwan, L. (2005). Chemical components and biological activities of volatile oil of *Kaempferia galangal* Linn. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27 (Suppl. 2), 503-507.
- Tolonen, M., Rajaniemi, S., Pihlava, J. M., Johansson, T., Saris, P. E. J., & Ryhänen, E. L. (2004). Formation of nisin, plant-derived biomolecules and antimicrobial activity in starter culture fermentations of sauerkraut. *Food Microbiology*, 21 (2), 167-179.
- Tripathi, P., Dubey, N. K., & Shukla, A. K. (2008). Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 (1), 39-46.
- Tsai, S. -Y., Huang, S. -J., Chyau, C. -C., Tsai, C. -H., Weng, C. -C., & Mau, J. -L. (2011). Composition and antioxidant properties of essential oils from *Curcuma* rhizome. *Asian Journal of Arts and Sciences*, 2 (1), 57-66.
- Tzortzakis, N. G. (2007). Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8 (1), 111–116.

- Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G. V., Zeytinoglu, H. S., & Vural, N. (2010). Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*). *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3274–3280.
- Valacchi, G., Pagnin, E., Corbacho, A. M., Olano, E., Davis, P. A., Packer, L., & Cross, C. E. (2004). In vivo ozone exposure induces antioxidant stress-related responses in murine lung and skin. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 673-681.
- Valero, D., Valverde, J. M., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Castillo, S., & Serrano, M. (2006). The combination of modified atmosphere packaging with eugenol or thymol to maintain quality, safety and functional properties of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 41 (3), 317–327.
- Veluri, R., Weir, T. L., Bais, H. P., Stermitz, F. R., & Vivanco, J. M. (2004). Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (5), 1077–1082.
- Vichitphan, S., Vichitphan, K. & Sirikhansaeng, P. (2007). Flavonoid content and antioxidant activity of Krachai-dun (*Kaempferia parviflora*) wine. *KMITL Science and Technology journal*, 7, 97–105.
- Wei, A., & Shibamoto, T. (2010). Medicinal activities of essential oil oils: Ade in disease prevention. In R. R. Watson, & V. R. Preedy (Eds.), *Bioactive foods in promoting health; fruits and vegetable* (pp. 59-70). New York; Elsevier Inc.
- Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., & Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80 (5), 1106-1122.
- Wu, Y., Wang, Y., Li, Z. -H., Wang, C. -F., Wei, J. -Y., Li, X. -L., Wang, P. -J., Zhou, Z. -F., Du, S. -S., Huang, D. -Y., & Deng, Z. -W. (2014). Composition of the essential oil from *Alpinia galangal* rhizomes and its bioactivity on *Lasioderma serricorne*. *Bulletin of Insectology*, 62 (2), 247-254.
- Xing, Y., Xu, Q., Li, X., Che, Z., & Yun, J. (2012). Antifungal activities of clove oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* *in vitro* and in wounded fruit test. *Journal of Food Safety*, 32, 84-93.
- Yoshida, H., Katsuzaki, H., Ohta, R., Ishikawa, K., Fukuda, H., Fujino, T., & Suzuki, A. (1999). Antimicrobial activity of the thiosulfinates isolated from oil-macerated garlic extract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63 (3), 591-594.
- Yousef, S. A. A. (2014). Essential oils: their antimicrobial activity and potential application against pathogens by gaseous contact - a review. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences G. Microbiology*, 6 (1), 37-54.

- Zaeoung, S., Plubrukarn, A., & Keawpradub, N. (2005). Cytotoxic and free radical scavenging activities of Zingiberaceous rhizomes. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27 (4), 799-812.
- Zhang, G. W. Ma, X. Q., Su, J. L., Zhang, K., Kurihara, H., YaoX. S., & Zeng L. M., (2006). Two new bioactive sesquiterpenes from the soft coral *Sinularia* sp. *Journal of Natural Products*, 20, 659-664.
- Zhang, X. (2003). *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants - Volume 2*. Geneva: World Health Organization, (Chapter 2).
- Znini, M., Cristofari, G., Majidi, L., Paolini, J., Desjobert, J. M., & Costa, J. (2013). Essential oil composition and antifungal activity of *Pulicaria mauritanica* Coss., against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *LWT-Food Science and Technology*, 54 (2), 564-569
- Zore, G. B., Thakre, A. D., Jadhav, S., & Karuppayil, S. M., (2011). Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine*, 18 (13), 1181-1190.

ภาคผนวก

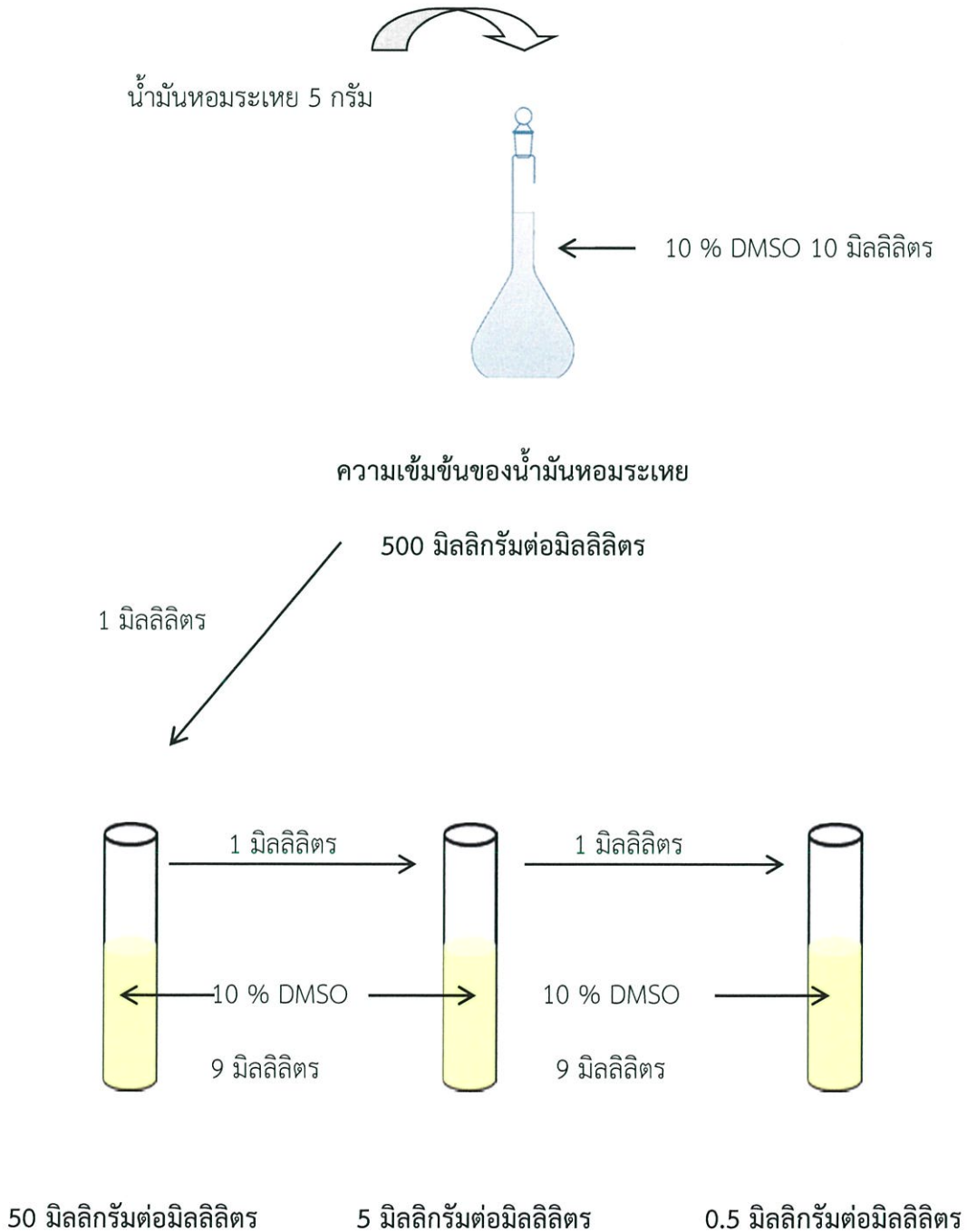
ภาคผนวก ก

การเตรียมน้ำมันหอมระเหยสำหรับการหาความเข้มข้นต่ำสุด

ในการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Agar dilution

1. วิธีการเตรียมน้ำมันหอมระเหยสำหรับการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum inhibition concentration, MIC) โดยวิธี Agar dilution

1.1 เตรียม stock solution ของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆดังขั้นตอนต่อไปนี้



จากนั้นนำ stock solution ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆมาผสมกับน้ำกลั่นและอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบดังตารางที่ ก.1

ตารางที่ ก.1 การเตรียมน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ในการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC)

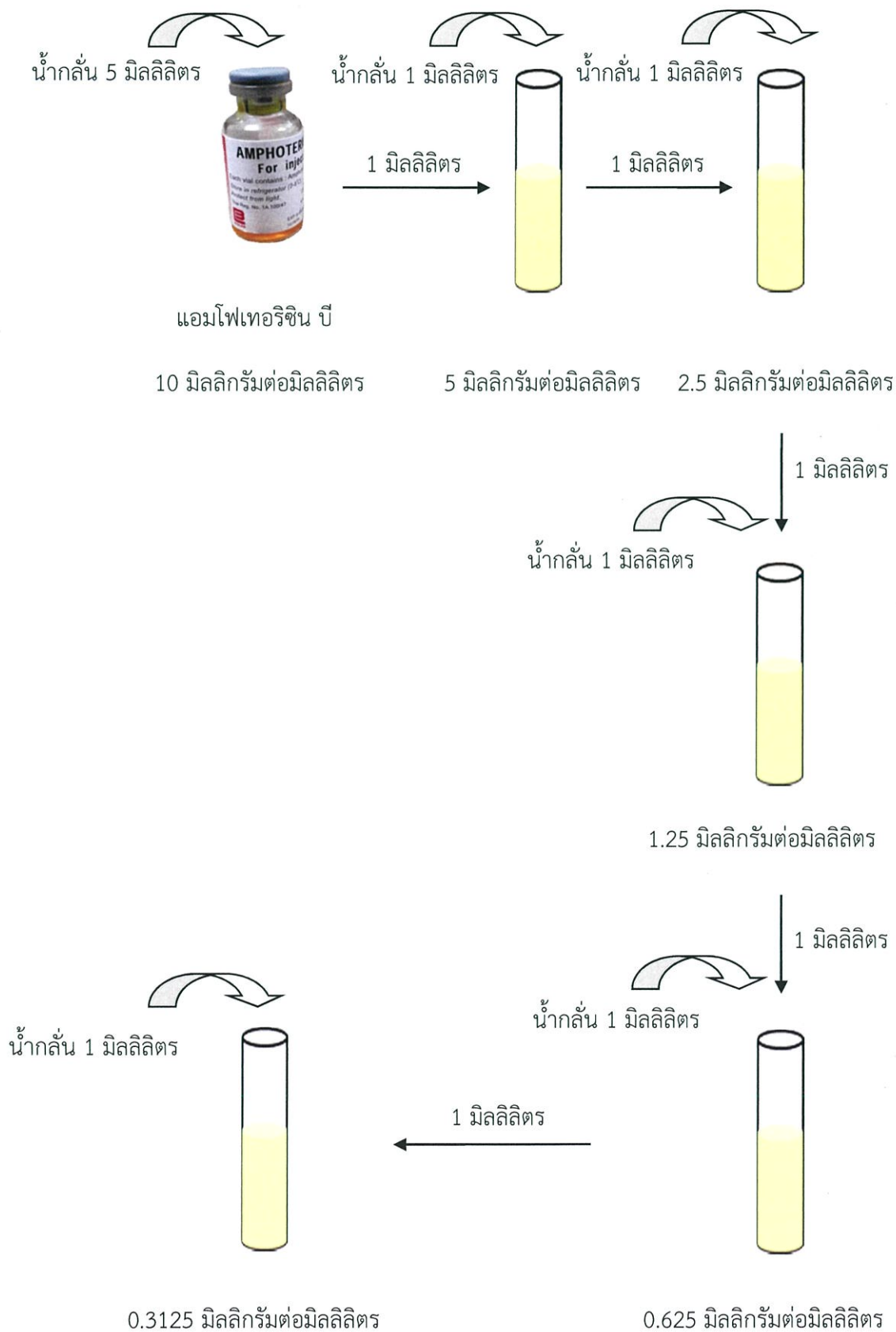
Stock ของ น้ำมันหอมระเหย (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ปริมาตรของ น้ำมันหอมระเหย (ไมโครลิตร)	ปริมาตรของ น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	ปริมาตรของ อาหารเลี้ยงเชื้อ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้น สุดท้าย (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)
500	100	25	2,375	20
	90	35	2,375	18
	80	45	2,375	16
	70	55	2,375	14
	60	65	2,375	12
	50	75	2,375	10
	40	85	2,375	8
	20	105	2,375	4
50	100	25	2,375	2
	50	75	2,375	1
	25	100	2,375	0.5
5	125	0	2,375	0.25
	62.5	62.5	2,375	0.125
	31.5	93.5	2,375	0.063
	15.5	109.5	2,375	0.031
0.5	75	50	2,375	0.015
	39	86	2,375	0.0078

ภาคผนวก ข

การเตรียมยาแอมโฟเทอริซิน บี สำหรับใช้เป็น

ชุดควบคุมเชิงบวกในการทดสอบ Agar disc diffusion

1. การเตรียมยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวกในการทดสอบ Agar disc diffusion



ตารางที่ ข.1 Stock ของยา Amphotericin B ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของเชื้อรา

Stock แอมโฟเทอริซิน บี (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณของ แอมโฟเทอริซิน บี (ไมโครลิตร)	ปริมาณของ อาหาร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
10	180	2,320	0.72
5	180	2,320	0.36
2.5	180	2,320	0.18
1.25	180	2,320	0.09
0.625	180	2,320	0.045
0.3125	180	2,320	0.0225

ตารางที่ ข.2 Stock ของยา Amphotericin B ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของยีสต์

Stock แอมโฟเทอริซิน บี (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณของ แอมโฟเทอริซิน บี (ไมโครลิตร)	ปริมาณของ อาหาร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
10	200	2,300	0.8
5	200	2,300	0.4
2.5	200	2,300	0.2
1.25	200	2,300	0.1
0.625	200	2,300	0.05
0.3125	200	2,300	0.025

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมีเพื่อใช้ในการวิเคราะห์

สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย

1. การเตรียมสารสำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช

การเตรียมสารละลาย DPPH ในเมทานอล ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์

น้ำหนักโมเลกุลของ DPPH เท่ากับ 394.33 กรัมต่อโมล

และ 1 โมล เท่ากับ 1000 มิลลิโมล

1000 มิลลิโมล มี DPPH 394.33 กรัม

ถ้า 0.1 มิลลิโมล มี DPPH $394.33 \times 0.1 / 1000 = 0.0394$ กรัม

ดังนั้น ชั่งสาร DPPH 0.0394 กรัม ละลายในเมทานอลเล็กน้อยแล้วจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ

2.1 acetate buffer ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์

ชั่ง $C_2H_2NaO_2 \cdot 3H_2O$ 3.1 กรัม ใน $C_2H_4O_2$ 16 มิลลิลิตร แล้วจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร

2.2 สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์

2.2.1 การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์

เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นโดยดูจากข้างขวด จะมี

ปริมาณเนื้อกรด	37	% น้ำหนัก/ปริมาตร
ความหนาแน่น	1.19	กรัมต่อลิตร
น้ำหนักโมเลกุล	36.5	กรัมต่อโมล

เริ่มจากหาความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกในขวดก่อน จากสูตร

$$C = 10dx / MW$$

เมื่อ $C =$ ความเข้มข้นหน่วยเป็น normal

$d =$ ความหนาแน่น

$$x = \% \text{ปริมาณเนื้อกรด}$$

$$\text{จะได้ } C = (10 \times 1.19 \times 37) / 36.5 = 12.06 \quad N$$

เนื่องจาก 1 molarity กรดไฮโดรคลอริก

$$N \text{ ที่คำนวณได้จึงเท่ากับ } 12.06 \quad M$$

เตรียมสารด้วยวิธีการเจือจาง โดยใช้สูตร

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

ต้องการเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ หรือ 0.04 โมลาร์ จากกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 12.06 โมลาร์ จะได้

$$\begin{aligned} V_1 &= 0.04 \times 1000 / 12.06 \\ &= 3.32 \text{ มิลลิกรัม} \end{aligned}$$

ดังนั้น ปิเปตกรดไฮโดรคลอริกมา 3.32 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ใน volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตรที่มีน้ำอยู่แล้ว แล้วจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร

2.2.2 สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์

น้ำหนักโมเลกุลของ TPTZ เท่ากับ 312.33 กรัมต่อโมล

$$1000 \text{ มิลลิโมล มีสาร TPTZ เท่ากับ } 312.33 \text{ กรัม}$$

$$\text{ถ้า } 10 \text{ มิลลิโมล มีสาร TPTZ เท่ากับ } 312.33 \times 10 / 1000 = 3.1233 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น ชั่ง TPTZ 3.1233 กรัม ละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ แล้วจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร

2.3 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

น้ำหนักโมเลกุลของ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ เท่ากับ 270.30 กรัมต่อโมล

$$1000 \text{ มิลลิโมล มีสาร } \text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \text{ เท่ากับ } 270.30 \text{ กรัม}$$

$$\text{ถ้า } 20 \text{ มิลลิโมล มีสาร } \text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \text{ เท่ากับ } 270.30 \times 20 / 1000 = 5.406 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น ชั่ง $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5.406 กรัม ละลายในน้ำเล็กน้อยแล้วจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร

2.4 การเตรียม standard curve ของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

-เตรียม $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ในช่วงความเข้มข้น 0.047-10 มิลลิโมลาร์

น้ำหนักโมเลกุลของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เท่ากับ 278.02 กรัมต่อโมล

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1000 มิลลิโมล มีเนื้อสาร 278.02 กรัม

ถ้า $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 มิลลิโมล มีเนื้อสาร $278.02 \times 10 / 1000 = 2.7802$ กรัม

เตรียมสารละลายปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ชั่ง $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.7802 กรัม

ถ้าเตรียมสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร ชั่ง $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $2.7802 \times 10 / 1000 = 0.278$ กรัม

ดังนั้น สารละลาย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ต้องชั่ง $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.278 กรัม ละลายในน้ำเล็กน้อยแล้วจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางต่อเพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นในช่วงที่ต้องการดังตารางที่ ค.1

ตารางที่ ค.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลาย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

ความเข้มข้นของ stock solution (มิลลิโมล)	ปริมาตรของ stock solution (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของ น้ำ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้ายของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (มิลลิโมล)
10	3	7	3
3	5	5	1.5
1.5	5	5	0.75
0.75	5	5	0.375
0.375	5	5	0.188
0.188	5	5	0.094
0.094	5	5	0.047

3. การเตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

3.1 การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 4.9 มิลลิโมลาร์

น้ำหนักโมเลกุลของโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตเท่ากับ 270.32 กรัมต่อโมล

1000 มิลลิโมล มีสารโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต เท่ากับ 270.32 กรัม

ถ้า 4.9 มิลลิโมล มีสารโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต เท่ากับ $270.32 \times 4.9 / 1000 = 1.3246$ กรัม

ดังนั้น ชั่งสารโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 1.3246 กรัม ละลายในน้ำเล็กน้อยแล้วจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร

3.2 การเตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์

น้ำหนักโมเลกุลของสาร ABTS เท่ากับ 548.68 กรัมต่อโมล

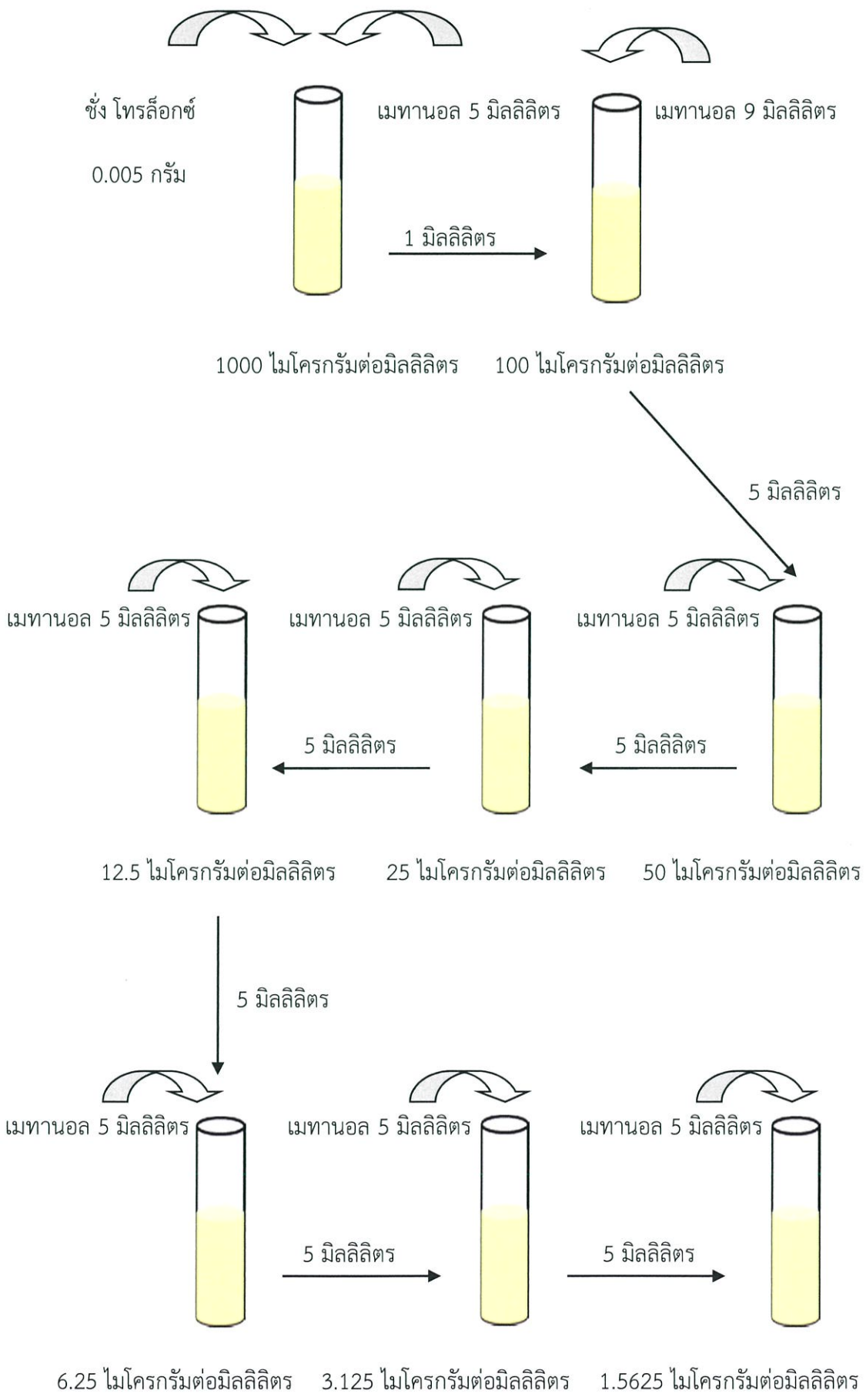
1000 มิลลิโมล มีสาร ABTS เท่ากับ 548.68 กรัม

ถ้า 7 มิลลิโมล มีสาร ABTS เท่ากับ $548.68 \times 7 / 1000 = 3.84076$ กรัม

ดังนั้น ชั่งสาร ABTS 3.84076 กรัม ละลายในน้ำเล็กน้อยแล้วจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร

3.3 สารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ (trolox)

สำหรับการทำกราฟมาตรฐานของสารละลายโทรล็อกซ์ ทำได้โดยเตรียมสารละลายโทรล็อกซ์ ที่ความเข้มข้น 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.5625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรดังนี้



4. การเตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหย

4.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

สารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะใช้สาร 20 กรัม

ดังนั้น ชั่งสารโซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัม ละลายในน้ำเล็กน้อยแล้วจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

4.2 สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

ชั่งกรดแกลลิก 0.1000 กรัม ละลายในน้ำเล็กน้อยแล้วจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร จะได้กรดแกลลิกความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ ค.2

ตารางที่ ค.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

ความเข้มข้นของ กรดแกลลิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรของ กรดแกลลิก (ไมโครลิตร)	ปริมาตรของ เมทานอล (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้ายของ กรดแกลลิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1000	5000	0	1000
1000	3750	1250	750
1000	2500	2500	500
1000	1250	3750	250
1000	500	4500	100
1000	250	4750	50
1000	125	4875	25
1000	50	4950	10

5. การเตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหย

5.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

สารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้สาร 5 กรัม

ดังนั้น ชั่งสารโซเดียมไนไตรท์ 5 กรัม ละลายในน้ำเล็กน้อยแล้วจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

5.2 การเตรียมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

สารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้สาร 10 กรัม

ดังนั้น ชั่งสารอะลูมิเนียมคลอไรด์ 10 กรัม ละลายในน้ำเล็กน้อยแล้วจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

5.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

จากมวลโมเลกุลของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์เท่ากับ 40 กรัมต่อโมล

ในสารละลายปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ต้องชั่งสาร 40 กรัม

ดังนั้น ถ้าเตรียมสารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต้องชั่งสาร 4 กรัม

5.4 สารละลายมาตรฐานคาเทชิน

ชั่งสารคาเทชิน 0.1000 กรัม ละลายในน้ำเล็กน้อยแล้วจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายคาเทชินความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ ค.3

ตารางที่ ค.3 การทำการเจือจางของสารละลายมาตรฐานคาเทชินที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ คาเทชิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรของ คาเทชิน (ไมโครลิตร)	ปริมาตรของ เมทานอล (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้ายของ คาเทชิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1000	5000	0	1000
1000	3750	1250	750
1000	2500	2500	500
1000	1250	3750	250
1000	500	4500	100
1000	250	4750	50
1000	125	4875	25
1000	50	4950	10

ภาคผนวก ง

ผลการศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์

โดยวิธี Agar disc diffusion

ตารางที่ ง.1 สมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยด้วยวิธีการแพร่บนวุ้นอาหาร (Agar disc diffusion method)

ชนิดของเชื้อรา	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง (มม.) ^a ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน								
	ว่านน้ำ	ข่า	โกฐเชียง	โกฐจุฬาลัมพา	อบเชย	ว่านนางคำ	ว่านเต่าเกียด	เปราะหอม	กานพลู
<i>Alternaria alternata</i>	^b -	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	8.40±0.24	-	-	7.64±0.90	25.47±7.25	-	13.24±2.80	10.92±1.65	32.25±4.76
<i>Aspergillus niger</i>	9.62±0.22	-	-	-	25.74±12.62	-	15.15±5.72	13.04±2.15	30.54±4.54
<i>Aspergillus ochraceus</i>	11.01±1.65	-	-	7.72±1.32	-	-	13.25±2.34	11.09±2.63	38.38±4.31
<i>Aspergillus parasiticus</i>	8.91±0.66	-	-	-	30.14±14.04	-	12.55±4.45	10.37±2.55	31.26±1.17
<i>Aspergillus terreus</i>	8.94±0.69	-	-	-	-	-	-	8.81±2.73	20.34±8.18
<i>Aspergillus versicolor</i>	8.90±0.51	-	-	-	28.36±10.15	-	15.70±4.16	9.41±0.51	27.05±4.63
<i>Fusarium moniliforme</i>	10.97±2.87	26.00±0.79	-	-	-	-	19.42±2.62	14.69±1.41	47.76±1.30
<i>Geotrichum candidum</i>	9.48±1.59	-	-	8.26±0.55	24.94±1.05	-	12.89±3.04	12.94±0.72	32.47±1.16
<i>Penicillium citrinum</i>	10.57±2.22	27.20±0.79	-	7.50±0.34	-	-	15.90±5.46	11.17±0.67	20.26±0.27
<i>Rhizopus stolonifera</i>	13.34±0.92	9.06±0.16	-	-	-	-	15.44±7.38	16.21±5.12	42.68±3.11
<i>Trichoderma harzianum</i>	11.59±2.33	-	-	-	12.79±0.01	-	-	11.06±0.60	-

^a ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ; ^b ไม่พบการยับยั้ง (ไม่เกิดโซนการยับยั้งการเจริญ)

ตารางที่ ง.2 สมบัติการยับยั้งการเจริญของยีสต์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยด้วยวิธีการแพร่บนวุ้นอาหาร (Agar disc diffusion method)

ชนิดของยีสต์	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง (มม.) ^a ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน								
	ว่านน้ำ	ข่า	โกฐเชียง	โกฐจุฬาลัมพา	อบเชย	ว่านนางคำ	ว่านเต่าเกิด	เปราะหอม	กานพลู
<i>Candida albicans</i>	-	7.30±0.09	-	-	42.80±0.08	^b -	12.35±0.14	9.43±0.03	18.78±0.04
<i>Candida lipolytica</i>	8.81±0.18	-	-	7.86±0.05	23.26±0.21	-	22.66±0.19	11.52±0.26	32.56±0.13
<i>Debaryomyces hansenii</i>	9.76±0.16	-	-	-	16.53±0.20	-	10.85±1.00	8.86±0.25	7.85±0.02
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	7.59±0.03	-	7.79±0.02	7.27±0.01	18.81±0.58	-	18.05±0.91	15.57±0.07	38.53±0.68
<i>Pichia membranaefaciens</i>	-	6.90±0.04	-	-	45.79±0.04	-	8.31±0.04	11.83±0.00	22.72±0.07
<i>Rhodotorula glutinis</i>	7.41±0.31	7.98±0.09	-	-	24.68±0.93	-	13.51±0.04	13.07±0.01	20.83±0.00
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	12.64±0.83	-	8.97±0.22	-	27.02±0.07	8.85±0.04	18.51±0.06	15.68±0.09	35.29±1.47
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	-	-	-	-	34.36±0.55	-	11.60±0.14	8.69±0.16	16.74±0.76

^a ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ; ^b ไม่พบการยับยั้ง (ไม่เกิดโซนการยับยั้งการเจริญ)

ตารางที่ ง.3 สมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของยา Amphotericin B (mg/ml) ด้วยวิธีการแพร่บนวุ้นอาหาร (Agar disc diffusion method)

ชนิดของเชื้อรา	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง (มม.) ^a ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน					
	10 (mg/ml)	5 (mg/ml)	2.5 (mg/ml)	1.25 (mg/ml)	0.625 (mg/ml)	0.3125 (mg/ml)
<i>Alternaria alternata</i>	23.14±5.13	18.92±3.39	15.89±6.49	15.29±1.75	10.42±0.03	^b -
<i>Aspergillus flavus</i>	11.99±4.33	10.35±2.55	9.82±0.53	8.52±0.43	8.33±1.08	6.52±0.57
<i>Aspergillus niger</i>	12.54±1.23	11.76±0.38	11.74±0.40	10.68±0.12	9.88±0.62	9.03±0.76
<i>Aspergillus ochraceus</i>	7.82±0.37	7.78±1.00	7.49±0.40	7.38±0.38	7.04±0.65	-
<i>Aspergillus parasiticus</i>	9.11±1.01	9.00±1.50	8.87±0.70	7.92±3.12	7.79±1.29	6.94±0.18
<i>Aspergillus terreus</i>	8.50±0.80	7.26±0.16	7.12±0.01	-	-	-
<i>Aspergillus versicolor</i>	11.84±0.64	10.72±0.13	10.41±0.82	8.46±1.06	8.36±0.80	-
<i>Fusarium moniliforme</i>	7.97±0.02	7.62±0.14	7.63±0.13	7.45±0.44	-	-
<i>Geotrichum candidum</i>	13.60±0.56	12.91±1.19	12.52±2.12	12.49±1.58	12.26±1.69	9.92±0.64
<i>Penicillium citrinum</i>	12.27±0.09	11.98±0.27	11.62±2.48	11.15±0.38	8.81±0.00	-
<i>Rhizopus stolonifera</i>	7.41±0.61	6.77±0.65	6.66±0.30	-	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	12.61±4.89	7.77±0.40	10.73±2.28	10.04±0.20	7.45±0.19	-

^a ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ; ^b ไม่พบการยับยั้ง (ไม่เกิดโซนการยับยั้งการเจริญ)

ตารางที่ ง.4 สมบัติการยับยั้งการเจริญของยีสต์ของยา Amphotericin B (mg/ml) ด้วยวิธีการแพร่บนวุ้นอาหาร (Agar disc diffusion method)

ชนิดของยีสต์	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง (มม.) ^a ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน					
	10 (mg/ml)	5 (mg/ml)	2.5 (mg/ml)	1.25 (mg/ml)	0.625 (mg/ml)	0.3125 (mg/ml)
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Candida lipolytica</i>	10.71±0.16	9.35±0.07	9.12±0.04	8.74±0.31	8.34±0.15	6.93±0.01
<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	13.79±0.28	10.88±0.14	10.49±0.05	10.32±0.06	9.84±0.26	9.62±0.30
<i>Pichia membranaefaciens</i>	8.80±0.04	8.28±0.09	8.17±0.02	8.07±0.00	8.01±0.01	-
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	19.41±0.04	17.83±0.01	17.59±0.04	16.85±0.00	16.07±0.06	15.97±0.07
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	-	-	-	-	-	-

^a ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ; ^b ไม่พบการยับยั้ง (ไม่เกิดโซนการยับยั้งการเจริญ)

ภาคผนวก จ

การหาค่า Fractional inhibitory concentration (FIC)

การคำนวณค่า FIC index (FICI)

และผลการศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ
เชื้อราและยีสต์

การหาค่า Fractional inhibitory concentration (FIC) และการคำนวณค่า FIC index (FICI)

ในการทดสอบหาค่า FIC index ของน้ำมันหอมระเหยผสม 2 ชนิด ด้วยวิธี agar dilution ซึ่งวิธีนี้ได้ทำการทดสอบบนอาหารแข็งในจานเพาะเชื้อโดยมีปริมาตรรวมทั้งหมด 20 มิลลิลิตร โดยมีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร น้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร รวมปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารที่ใช้ทดสอบปริมาตร 19 มิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดเมื่อผสมกับอาหารที่ใช้ทดสอบปริมาตร 19 มิลลิลิตร แล้วจะมีค่าเท่ากับ 1/2, 1/4, 1/8 และ 1/16 ของค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด

ตัวอย่างการหาค่า FIC ของคู่น้ำมันหอมระเหยผสมระหว่างน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลูในการยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans*

จากการทดลองพบว่าค่า MIC ของน้ำมันอบเชยในการยับยั้ง *C. albicans* เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำมันกานพลูเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยคู่อของรูปแบบการผสมแต่ระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองนั้นแสดงดังตารางที่ จ.1

ตารางที่ จ.1 รูปแบบของการผสมของน้ำมันหอมระเหย

รูปแบบ	น้ำมันอบเชย		น้ำมันกานพลู	
	จำนวนเท่าของ MIC	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/ml)	จำนวนเท่าของ MIC	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/ml)
1	1/2	0.25	1/2	0.5
2	1/2	0.25	1/4	0.25
3	1/2	0.25	1/8	0.125
4	1/2	0.25	1/16	0.0625
5	1/4	0.125	1/2	0.5
6	1/4	0.125	1/4	0.25
7	1/4	0.125	1/8	0.125
8	1/4	0.125	1/16	0.0625
9	1/8	0.0625	1/2	0.5
10	1/8	0.0625	1/4	0.25
11	1/8	0.0625	1/8	0.125
12	1/8	0.0625	1/16	0.0625
13	1/16	0.03125	1/2	0.5
14	1/16	0.03125	1/4	0.25
15	1/16	0.03125	1/8	0.125
16	1/16	0.03125	1/16	0.0625

ก) การคำนวณหาความเข้มข้นของ stock solution ของน้ำมันหอมระเหยรูปแบบที่ 1

เมื่อความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันอบเชยเท่ากับ $1/2$ เท่าของค่า MIC = $1/2 \times 0.5 = 0.25$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันกานพลูเท่ากับ $1/2$ เท่าของค่า MIC = $1/2 \times 1 = 0.5$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการคำนวณหาความเข้มข้นของ stock solution ของน้ำมันหอมระเหยที่ต้องการเตรียมสามารถคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

เมื่อ C_1 คือความเข้มข้นของ stock solution ของน้ำมันหอมระเหยที่ต้องการเตรียม

V_1 คือปริมาณของน้ำมันหอมระเหยที่เติมลงไป (ในการทดสอบเติมลงไปปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร)

C_2 คือความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ในการทดสอบ (ซึ่งในที่นี้ น้ำมันอบเชยคือ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำมันกานพลูคือ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

V_2 คือปริมาตรรวมสุดท้ายในการทดสอบซึ่งเท่ากับ 20 มิลลิลิตร (อาหารที่ใช้ทดสอบ 19 มิลลิลิตร + น้ำมันอบเชย 0.5 มิลลิลิตร + น้ำมันกานพลู 0.5 มิลลิลิตร)

ดังนั้นความเข้มข้นของ stock solution ของน้ำมันอบเชย คือ

$$C_1 = C_2V_2 / V_1$$

$$C_1 = 0.25 \times 20 / 0.5 = 10 \text{ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}$$

เตรียมได้โดยชั่งน้ำมันอบเชย 0.1 กรัม ละลายในสารละลาย DMSO ร้อยละ 10 โดยปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร ก็จะได้ stock solution ของน้ำมันอบเชยความเข้มข้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นของ stock solution ของน้ำมันกานพลู คือ

$$C_1 = C_2V_2 / V_1$$

$$C_1 = 0.5 \times 20 / 0.5 = 20 \text{ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}$$

เตรียมได้โดยชั่งน้ำมันอบเชย 0.2 กรัม ละลายในสารละลาย DMSO ร้อยละ 10 โดยปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร ก็จะได้ stock solution ของน้ำมันอบเชยความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อเตรียม stock solution ของน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นเท่ากับ $1/2$ เท่าของค่า MIC (รูปแบบที่ 1) แล้วจากนั้นปิเปต stock solution ของน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ stock solution ของน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาชนิดละ 0.5 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ และเทอาหารที่ใช้ทดสอบ (YMA) ที่ยังหลอมเหลวอยู่ปริมาตร 19 มิลลิลิตร จากนั้นวนจานเพาะเชื้อเพื่อผสมให้เข้ากันก็จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันอบเชยในจานเพาะเชื้อเท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันกานพลูในจานเพาะเชื้อเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รอให้อาหารแข็งตัว แล้วจึงทำการปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของยีสต์ที่ทดสอบลงไปตรงกลางจานเพาะเชื้อ เสร็จแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เมื่อครบระยะเวลาในการบ่ม (เป็นเวลา 3 วัน) ให้นำจานเพาะเชื้อมาตรวจสอบการเจริญของจุลินทรีย์ที่เพาะลงไป ซึ่งจะหาค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยรูปแบบการผสมคู่ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญได้หรือไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในการวิเคราะห์หาค่า FIC และ FICI

สำหรับการเตรียม stock solution ของน้ำมันหอมระเหยรูปแบบอื่นๆ สามารถทำได้โดยการเจือจาง 2 เท่า (two-fold dilution) จาก stock solution ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 2 ชนิด ที่เตรียมไว้แล้วข้างต้น (รูปแบบที่ 1) ด้วยสารละลาย DMSO ร้อยละ 10 ก็จะได้ stock solution ที่เจือจางอีก 3 ระดับ นั่นคือน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเจือจางแล้วจะได้น้ำมันอบเชยที่มีความเข้มข้น 5, 2.5, และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งมีค่าเท่ากับ 1/4, 1/8 และ 1/16 เท่าของค่า MIC ตามลำดับ ส่วนน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเจือจางแล้วจะได้น้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น 10, 5, และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งมีค่าเท่ากับ 1/4, 1/8 และ 1/16 เท่าของค่า MIC ตามลำดับ จากนั้นนำแต่ละความเข้มข้นของน้ำมันทั้ง 2 ชนิด มาผสมกันอีก 15 รูปแบบดังตารางที่ 1 (ก็จะได้ความเข้มข้นของ stock solution ทุกรูปแบบการผสมครบ 16 รูปแบบดังตารางที่ จ.2) แล้วทำการทดสอบและตรวจผลตามวิธีการเช่นเดียวกับรูปแบบที่ 1 ที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น

ตารางที่ จ.2 ความเข้มข้นของ stock solution กับความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันอบเชยน้ำมันกานพลู

รูปแบบ	น้ำมันอบเชย			น้ำมันกานพลู		
	stock solution (mg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/ml)	จำนวนเท่าของ MIC	stock solution (mg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/ml)	จำนวนเท่าของ MIC
1	10	0.25	1/2	20	0.5	1/2
2	10	0.25	1/2	10	0.25	1/4
3	10	0.25	1/2	5	0.125	1/8
4	10	0.25	1/2	2.5	0.0625	1/16
5	5	0.125	1/4	20	0.5	1/2
6	5	0.125	1/4	10	0.25	1/4
7	5	0.125	1/4	5	0.125	1/8
8	5	0.125	1/4	2.5	0.0625	1/16
9	2.5	0.0625	1/8	20	0.5	1/2
10	2.5	0.0625	1/8	10	0.25	1/4
11	2.5	0.0625	1/8	5	0.125	1/8
12	2.5	0.0625	1/8	2.5	0.0625	1/16
13	1.25	0.03125	1/16	20	0.5	1/2
14	1.25	0.03125	1/16	10	0.25	1/4

ตารางที่ จ.2 ความเข้มข้นของ stock solution กับความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันอบเชยน้ำมันกานพลู (ต่อ)

รูปแบบ	น้ำมันอบเชย			น้ำมันกานพลู		
	stock solution (mg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/ml)	จำนวนเท่าของ MIC	stock solution (mg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/ml)	จำนวนเท่าของ MIC
15	1.25	0.03125	1/16	5	0.125	1/8
16	1.25	0.03125	1/16	2.5	0.0625	1/16

ข) การคำนวณค่า fractional inhibitory concentration (FIC) และค่า fractional inhibitory concentration index (FICI)

เมื่อเพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงไปในงานอาหาร YMA แต่ละงานที่มีน้ำมันหอมระเหยแต่ละรูปแบบการผสมแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ครบตามเวลาแล้วตรวจผลโดยดูว่าเชื้อเจริญหรือไม่ จากผลการทดลองพบว่าน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลูรูปแบบที่ 1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* (ตารางที่ จ.3) ในการคำนวณจะนำค่าความเข้มข้นสุดท้ายที่ต่ำสุดของน้ำมันผสมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มาใช้ในการคำนวณหาค่า FIC

ตารางที่ จ.3 การยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* โดยน้ำมันผสมระหว่างอบเชยกับกานพลู

รูปแบบ	น้ำมันอบเชย		น้ำมันกานพลู		ผลการยับยั้ง
	จำนวนเท่าของ MIC	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/ml)	จำนวนเท่าของ MIC	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/ml)	
1	1/2	0.25	1/2	0.5	+
2	1/2	0.25	1/4	0.25	-
3	1/2	0.25	1/8	0.125	-
4	1/2	0.25	1/16	0.0625	-
5	1/4	0.125	1/2	0.5	-
6	1/4	0.125	1/4	0.25	-
7	1/4	0.125	1/8	0.125	-
8	1/4	0.125	1/16	0.0625	-
9	1/8	0.0625	1/2	0.5	-
10	1/8	0.0625	1/4	0.25	-
11	1/8	0.0625	1/8	0.125	-
12	1/8	0.0625	1/16	0.0625	-
13	1/16	0.03125	1/2	0.5	-
14	1/16	0.03125	1/4	0.25	-

จากผลการคำนวณค่า FIC ของน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *C. albicans* ค่าที่ได้คือ 1 จึงเป็นการบอกได้ว่าการผสมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันอบเชยหรือน้ำมันกานพลูเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งในการยับยั้งเชื้อนี้

ตารางที่ จ.4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยเมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_c) ค่า fractional inhibitory concentration (FIC) และค่า FIC index (FICI) ของน้ำมันผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลู น้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

เชื้อรา	MIC _a		MIC _c		FIC		FICI	การแปลผลค่า FICI
	MIC _{a1}	MIC _{a2}	MIC _{c1}	MIC _{c2}	FIC ₁	FIC ₂		
น้ำมันอบเชย (1) + น้ำมันว่านเต่าเกียด (2)								
<i>Alternaria alternata</i>	0.125	1	0.008	0.5	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Fusarium moniliforme</i>	0.125	1	0.02	0.5	0.16	0.5	0.66	partial synergism
<i>Geotrichum candidum</i>	0.125	1	0.06	0.25	0.48	0.25	0.73	partial synergism
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0.25	1	0.02	0.5	0.08	0.5	0.58	partial synergism
น้ำมันกานพลู (1) + น้ำมันว่านเต่าเกียด (2)								
<i>Alternaria alternata</i>	0.5	1	0.25	0.5	0.5	0.5	1	no effect
<i>Fusarium moniliforme</i>	0.5	1	0.03	0.5	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0.5	1	0.03	0.5	0.06	0.5	0.56	partial synergism

MIC_{a1} หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันชนิดที่ 1 เพียงชนิดเดียว และ MIC_{a2} หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันชนิดที่ 2 เพียงชนิดเดียว

MIC_{c1} หมายถึงค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม และ MIC_{c2} หมายถึง ค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม

FIC₁ คำนวณได้จากค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_{c1}) หารด้วยค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เพียงชนิดเดียว (MIC_{a1})

FIC₂ คำนวณได้จากค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_{c2}) หารด้วยค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เพียงชนิดเดียว (MIC_{a2})

FICI หมายถึงผลรวมของ FIC₁ (FIC ของน้ำมันชนิดที่ 1) กับ FIC₂ (FIC ของน้ำมันชนิดที่ 2)

FICI น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 หมายถึงเสริมฤทธิ์กัน มากกว่า 0.5 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.75 หมายถึงเสริมฤทธิ์กันบางส่วน มากกว่า 0.75 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 หมายถึงไม่มีผล และมากกว่า 2 หมายถึงเป็นปฏิปักษ์กัน

ตารางที่ จ.5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยเมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_c) ค่า fractional inhibitory concentration (FIC) และค่า FIC index (FICI) ของน้ำมันผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลู น้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียด ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์

ยีสต์	MIC_a		MIC_c		FIC		FICI	การแปลผล ค่า FICI
	MIC_{a1}	MIC_{a2}	MIC_{c1}	MIC_{c2}	FIC_1	FIC_2		
น้ำมันอบเชย (1) + น้ำมันกานพลู (2)								
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0.5	1	0.25	0.5	0.5	0.5	1	no effect
น้ำมันอบเชย (1) + น้ำมันว่านเต่าเกียด (2)								
<i>Candida lipolytica</i>	0.5	1	0.03	0.5	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0.5	1	0.03	0.5	0.06	0.5	0.56	partial synergism
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0.5	1	0.125	0.5	0.25	0.5	0.75	partial synergism
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0.5	1	0.25	0.5	0.5	0.5	1	no effect
น้ำมันกานพลู (1) + น้ำมันว่านเต่าเกียด (2)								
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1	1	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	synergism

MIC_{a1} หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันชนิดที่ 1 เพียงชนิดเดียว และ MIC_{a2} หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันชนิดที่ 2 เพียงชนิดเดียว

MIC_{c1} หมายถึงค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม และ MIC_{c2} หมายถึง ค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม

FIC_1 คำนวณได้จากค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_{c1})หารด้วยค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เพียงชนิดเดียว (MIC_{a1})

FIC_2 คำนวณได้จากค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_{c2})หารด้วยค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เพียงชนิดเดียว (MIC_{a2})

FICI หมายถึงผลรวมของ FIC_1 (FIC ของน้ำมันชนิดที่ 1) กับ FIC_2 (FIC ของน้ำมันชนิดที่ 2)

FICI น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 หมายถึงเสริมฤทธิ์กัน มากกว่า 0.5 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.75 หมายถึงเสริมฤทธิ์กันบางส่วน มากกว่า 0.75 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 หมายถึงไม่มีผล และมากกว่า 2 หมายถึงเป็นปฏิปักษ์กัน

ภาคผนวก ฉ

การคำนวณหาค่าสมบัติทางพิษเคมีของน้ำมันหอมระเหย

ด้วยวิธีต่างๆ

1. การคำนวณสำหรับหาค่า IC₅₀ ด้วยวิธี DPPH assay

ในการคำนวณหาค่า IC₅₀ ของน้ำมันอบเชยโดยทำการทดสอบที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมทั้งหมด 6 ระดับ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันอบเชยทั้ง 6 ระดับ คือ 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นนำค่าความเข้มข้นทั้ง 6 ระดับไปวิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical จากสูตร

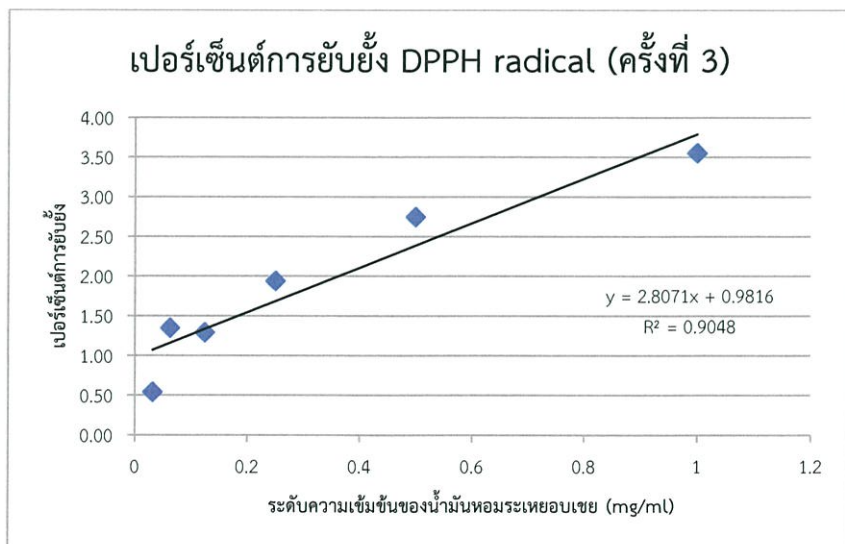
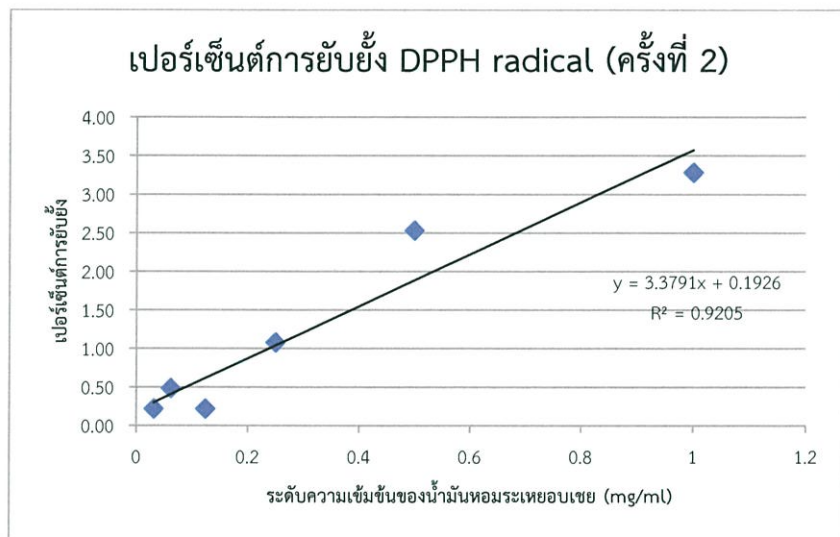
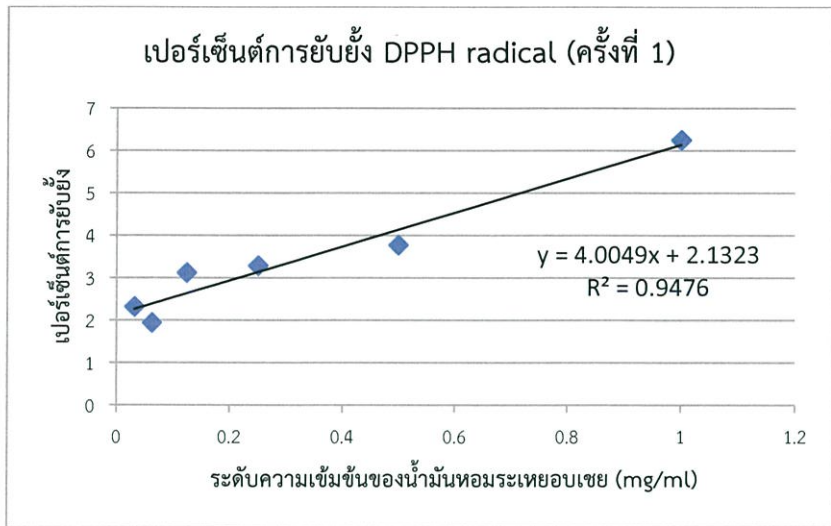
$$\%I = (A_o - A_s) / A_o \times 100$$

เมื่อ A_o คือค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (เมทานอลแทนน้ำมันอบเชย) และ A_s คือค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันหอมระเหยในแต่ละความเข้มข้น ซึ่งทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยจากผลการทดลองทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงและค่าร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical ดังตารางที่

ตารางที่ ๑.1 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical

ความเข้มข้นของ น้ำมันอบเชย (mg/ml)	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	A ₅₁₇	% I	A ₅₁₇	% I	A ₅₁₇	% I
control	0.929	-	0.929	-	0.929	-
1	0.871	6.25	0.898	3.28	0.896	3.55
0.5	0.894	3.77	0.905	2.53	0.903	2.75
0.25	0.898	3.28	0.919	1.08	0.911	1.94
0.125	0.900	3.12	0.927	0.22	0.917	1.29
0.0625	0.911	1.94	0.924	0.48	0.916	1.35
0.03125	0.907	2.32	0.927	0.22	0.924	0.54

จากนั้นทำการสร้างกราฟระหว่างร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical กับน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า IC₅₀



รูปที่ ๑.1 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง DPPH radical ของน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้นต่างๆ

เมื่อสร้างกราฟระหว่างร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical กับน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้นต่างๆแล้วจะได้สมการเส้นตรง ซึ่งจากสมการเส้นตรงนี้จะสามารถหาค่า IC_{50} ได้ดังนี้

ก) การหาค่า IC_{50} ครั้งที่ 1

$$\text{สมการเส้นตรง คือ } y = 4.0049x + 2.1323$$

เมื่อ $y = 50$ (ร้อยละ 50) แทนค่าในสมการ

$$50 = 4.0049x + 2.1323$$

$$\text{จะได้ } x = 11.952$$

ในการทดสอบครั้งที่ 1 ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 11.952 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ข) การหาค่า IC_{50} ครั้งที่ 2

$$\text{สมการเส้นตรง คือ } y = 3.3791x + 0.1926$$

เมื่อ $y = 50$ (ร้อยละ 50) แทนค่าในสมการ

$$50 = 3.3791x + 0.1926$$

$$\text{จะได้ } x = 14.740$$

ในการทดสอบครั้งที่ 2 ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 14.740 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ค) การหาค่า IC_{50} ครั้งที่ 3

$$\text{สมการเส้นตรง คือ } y = 2.8071x + 0.9816$$

เมื่อ $y = 50$ (ร้อยละ 50) แทนค่าในสมการ

$$50 = 2.8071x + 0.9816$$

$$\text{จะได้ } x = 17.462$$

ในการทดสอบครั้งที่ 3 ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 17.462 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากนั้นนำค่า IC_{50} ที่ได้จากการคำนวณทั้ง 3 ค่ามาหาค่าเฉลี่ยจะได้

$$\begin{aligned} IC_{50} \text{ เฉลี่ย} &= (11.952 + 14.740 + 17.462) / 3 \\ &= 14.718 \end{aligned}$$

ดังนั้นการหาค่า IC_{50} ของน้ำมันอบเชยจึงมีค่าเท่ากับ 14.718 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การคำนวณสำหรับการวิเคราะห์หากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

การวิเคราะห์หากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay สารละลายมาตรฐานที่ใช้คือเฟอร์ริซัลเฟตที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.1875, 0.09375 และ 0.046875 มิลลิโมลต่อลิตร ทำการทดลองแบบเดียวกับน้ำมันหอมระเหย ซึ่งในวิธีการทดลองจะใช้สารละลายมาตรฐานเฟอร์ริซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพราะฉะนั้นในหลอดทดลองของสารละลายมาตรฐานเฟอร์ริซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ จะมีเนื้อสารเฟอร์ริซัลเฟตดังนี้

สารละลายมาตรฐานเฟอร์ริซัลเฟตที่ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลต่อลิตร

ในหลอดทดลองจะมีสารละลายมาตรฐานเฟอร์ริซัลเฟตความเข้มข้น 3 มิลลิโมลต่อลิตร อยู่ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (0.1 มิลลิลิตร) เพราะฉะนั้นในหลอดทดลองนี้จะมีเนื้อสารเฟอร์ริซัลเฟตเท่ากับ

สารละลายปริมาตร 1,000 ml	มีเนื้อสารเฟอร์ริซัลเฟต	3 mmol
ดังนั้น สารละลายปริมาตร 0.1 ml	มีเนื้อสารเฟอร์ริซัลเฟต	
		$0.1 \text{ ml} \times 3 \text{ mmol} / 1000 \text{ ml}$
		$= 0.0003 \text{ mmol}$

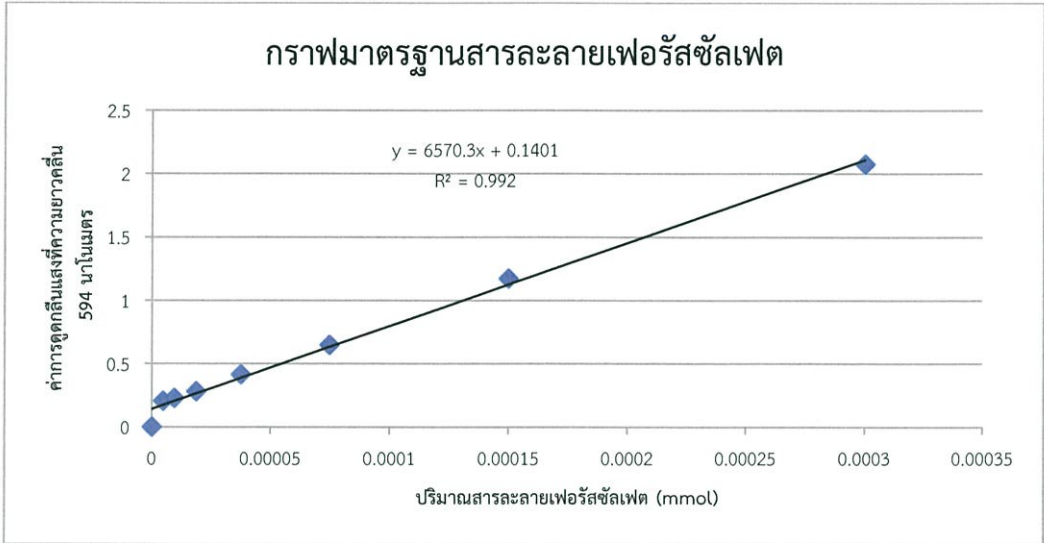
สารละลายมาตรฐานเฟอร์ริซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลต่อลิตร

ในหลอดทดลองจะมีสารละลายมาตรฐานเฟอร์ริซัลเฟตความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลต่อลิตร อยู่ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (0.1 มิลลิลิตร) เพราะฉะนั้นในหลอดทดลองนี้จะมีเนื้อสารเฟอร์ริซัลเฟตเท่ากับ

สารละลายปริมาตร 1,000 ml	มีเนื้อสารเฟอร์ริซัลเฟต	1.5 mmol
ดังนั้น สารละลายปริมาตร 0.1 ml	มีเนื้อสารเฟอร์ริซัลเฟต	
		$0.1 \text{ ml} \times 1.5 \text{ mmol} / 1000 \text{ ml}$
		$= 0.00015 \text{ mmol}$

ดังนั้นสารละลายมาตรฐานเฟอร์ริซัลเฟตที่ความเข้มข้น 3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.1875, 0.09375 และ 0.046875 มิลลิโมลต่อลิตร โดยจะปิเปตใช้ในการทดลองปริมาตร 100 ไมโครลิตร จึง

มีเนื้อสารของเฟอรัสซัลเฟตอยู่ในแต่ละหลอดทดลองเท่ากับ 0.0003, 0.00015, 0.000075, 0.0000375, 0.0000188, 0.0000094 และ 0.0000047 มิลลิโมล ตามลำดับ จากนั้นทำการพลอตกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร กับปริมาณเนื้อสารของเฟอรัสซัลเฟตในหน่วยมิลลิโมลได้ดังนี้



รูปที่ ๑.2 กราฟมาตรฐานสารละลายเฟอรัสซัลเฟตสำหรับการวิเคราะห์หากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี (FRAP) assay แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร กับปริมาณเนื้อสารของเฟอรัสซัลเฟตหน่วยมิลลิโมล (ซ้ำที่ 1)

ตัวอย่างที่ ๑.1 การคำนวณหากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี (FRAP) assay ของน้ำมันหอมระเหยว่านน้ำ (ซ้ำที่ 1) โดยนำเอาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร ของน้ำมันหอมระเหยว่านน้ำมาแทนค่า y ในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสารละลายเฟอรัสซัลเฟตดังนี้

น้ำมันหอมระเหยว่านน้ำมีค่า A_{594} เท่ากับ 0.941

จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสารละลายเฟอรัสซัลเฟต

$$y = 6570.3x + 0.1401$$

เมื่อ x คือ ปริมาณเนื้อสารของเฟอรัสซัลเฟต (มิลลิโมล)

y คือ ค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร

$$\text{แทนค่า } 0.941 = 6570.3x + 0.1401$$

$$x = 0.941 - 0.1401 / 6570.3$$

$$= 1.22 \times 10^{-4} \text{ mmol}$$

โดยในการทดลองจะใช้น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (0.1 มิลลิลิตร) เพราะฉะนั้นในหลอดทดลองจะมีปริมาณเนื้อสารของน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ

	สารละลายปริมาตร 1 ml	มีน้ำมันหอมระเหย	1 mg
ดังนั้น	สารละลายปริมาตร 0.1 ml	มีน้ำมันหอมระเหย	$0.1 \text{ ml} \times 1 \text{ ml} / 1 \text{ ml}$
			= 0.1 mg

โดยน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตใช้ในการทดลองปริมาตร 100 ไมโครลิตร จะมีน้ำมันหอมระเหยอยู่ 0.1 มิลลิกรัม ซึ่งจะรายงานผลในหน่วยมิลลิโมลของเฟอรัสซัลเฟตต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย

ดังนั้นในน้ำมันหอมระเหย 0.1 mg มีปริมาณเนื้อสารเฟอรัสซัลเฟตเท่ากับ 1.22×10^{-4} mmol

ถ้าน้ำมันหอมระเหย 1 mg มีปริมาณเนื้อสารของเฟอรัสซัลเฟตเท่ากับ

$$1 \text{ ml} \times (1.22 \times 10^{-4}) \text{ mmol} / 0.1 \text{ mg} = 1.22 \times 10^{-3} \text{ mmol/mg}$$

ถ้าน้ำมันหอมระเหย 1 g มีปริมาณเนื้อสารของเฟอรัสซัลเฟตเท่ากับ

$$1000 \text{ mg} \times (1.22 \times 10^{-4}) \text{ mmol} / 0.1 \text{ mg} = 1.22 \text{ mmol/g}$$

เพราะฉะนั้น น้ำมันหอมระเหยว่าน้ำมีปริมาณเฟอรัสซัลเฟตเท่ากับ 1.22 มิลลิโมลของเฟอรัสซัลเฟตต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย

3. การคำนวณสำหรับการวิเคราะห์หากิจกรรมการการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical cation decolorization assay

การวิเคราะห์หากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical cation decolorization assay สารละลายมาตรฐานที่ใช้คือไทรอล็อกซ์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1,000, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.5625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองแบบเดียวกับน้ำมันหอมระเหย ซึ่งในวิธีการทดลองจะใช้สารละลายมาตรฐานไทรอล็อกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เพราะฉะนั้นในหลอดทดลองของสารละลายมาตรฐานไทรอล็อกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ จะมีเนื้อสารไทรอล็อกซ์ดังนี้

สารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในหลอดทดลองจะมีสารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (0.03 มิลลิลิตร) เพราะฉะนั้นในหลอดทดลองนี้จะมีเนื้อสารโทรล็อกซ์เท่ากับ

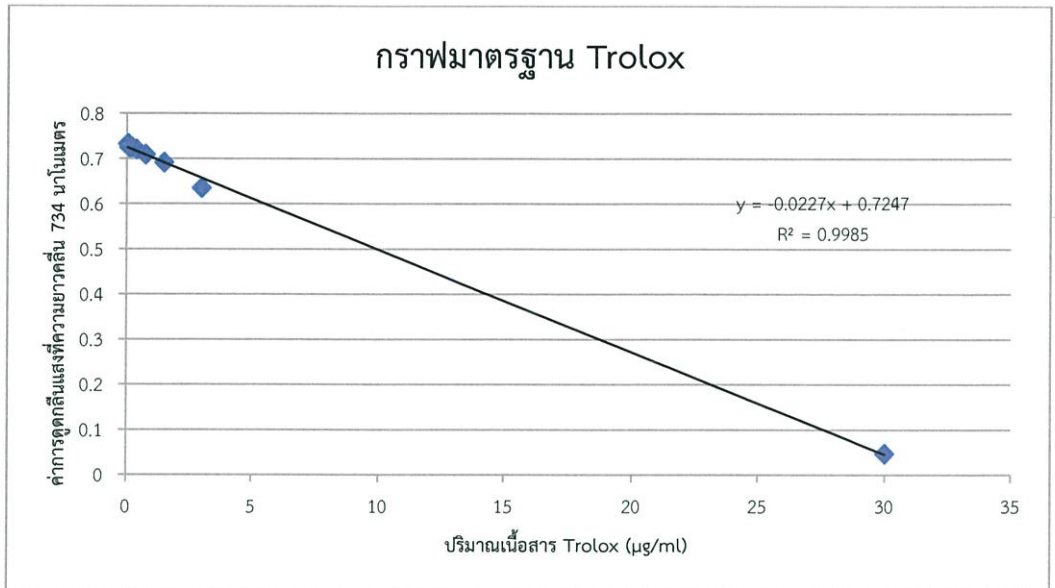
สารละลายปริมาตร 1 ml	มีเนื้อสารโทรล็อกซ์	1,000 μ g
ดังนั้น สารละลายปริมาตร 0.03 ml	มีเนื้อสารโทรล็อกซ์	$0.03 \text{ ml} \times 1000 \mu\text{g} / 1 \text{ ml}$ $= 30 \mu\text{g}$

สารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในหลอดทดลองจะมีสารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (0.03 มิลลิลิตร) เพราะฉะนั้นในหลอดทดลองนี้จะมีเนื้อสารโทรล็อกซ์เท่ากับ

สารละลายปริมาตร 1 ml	มีเนื้อสารโทรล็อกซ์	100 μ g
ดังนั้น สารละลายปริมาตร 0.03 ml	มีเนื้อสารโทรล็อกซ์	$0.03 \text{ ml} \times 100 \mu\text{g} / 1 \text{ ml}$ $= 3 \mu\text{g}$

ดังนั้นสารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้น 1,000, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.5625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจะปิเปตใช้ในการทดลองปริมาตร 30 ไมโครลิตร จึงมีเนื้อสารของโทรล็อกซ์อยู่ในแต่ละหลอดทดลองเท่ากับ 30, 3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.1875, 0.09375 และ 0.046875 ไมโครกรัม ตามลำดับ จากนั้นทำการพลอตกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร กับปริมาณเนื้อสารของโทรล็อกซ์ในหน่วยไมโครกรัมได้ดังนี้



รูปที่ ๓.3 กราฟมาตรฐานสารละลายโทรลล๊อกซ์สำหรับการวิเคราะห์หาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร กับปริมาณเนื้อสารของโทรลล๊อกซ์ในหน่วยไมโครกรัม (ซ้ำที่ 1)

ตัวอย่างที่ ๓.2 การคำนวณหาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยว่านน้ำ (ซ้ำที่ 1) โดยนำเอาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ของน้ำมันหอมระเหยว่านน้ำมาแทนค่า y ในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสารละลายกรดโทรลล๊อกซ์ดังนี้

น้ำมันหอมระเหยว่านน้ำมีค่า A_{734} เท่ากับ 0.697

จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสารละลายโทรลล๊อกซ์

$$y = -0.0227x + 0.7247$$

เมื่อ x คือ ปริมาณเนื้อสารของโทรลล๊อกซ์ (ไมโครกรัม)

Y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

$$\text{แทนค่า} \quad 0.697 = -0.0227x + 0.7247$$

$$X = 0.697 - 0.7247 / -0.0227$$

$$= 1.220 \mu\text{g}$$

โดยในการทดลองจะใช้น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (0.03 มิลลิลิตร) เพราะฉะนั้นในหลอดทดลองจะมีปริมาณเนื้อสารของน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ

สารละลายปริมาตร 1 ml	มีน้ำมันหอมระเหย	1 mg
ดังนั้น สารละลายปริมาตร 0.03 ml	มีน้ำมันหอมระเหย	$0.03 \text{ ml} \times 1 \text{ ml} / 1 \text{ ml}$
		$= 0.03 \text{ mg}$

โดยน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บีเบตใช้ในการทดลองปริมาตร 30 ไมโครลิตร จะมีน้ำมันหอมระเหยอยู่ 0.03 มิลลิกรัม ซึ่งจะรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของโทรลีสออกซ์ต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย

ดังนั้นปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันหอมระเหย 0.03 มิลลิลิตร เทียบกับปริมาณเนื้อสารของโทรลีสออกซ์เท่ากับ 1.220 μg

$$\begin{aligned} \text{ถ้า น้ำมันหอมระเหย 1 mg มีปริมาณเนื้อสารของโทรลีสออกซ์} & 1 \text{ ml} \times 1.220 \mu\text{g} / 0.03 \text{ mg} \\ & = 40.68 \mu\text{g/mg} \end{aligned}$$

ถ้า น้ำมันหอมระเหย 1 g มีปริมาณเนื้อสารของโทรลีสออกซ์

$$\begin{aligned} 1000 \text{ ml} \times 1.220 \mu\text{g} / 0.03 \mu\text{g} & = 40,675 \mu\text{g/g} \\ 40675 / 1000 & = 40.68 \text{ mg/g} \end{aligned}$$

เพราะฉะนั้น น้ำมันหอมระเหยว่าน้ำมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 40.68 มิลลิกรัมของโทรลีสออกซ์ต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย

4. การคำนวณสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยสารละลายมาตรฐานที่ใช้คือกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1,000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองแบบเดียวกับน้ำมันหอมระเหย ซึ่งในวิธีการทดลองจะใช้สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพราะฉะนั้นในหลอดทดลองของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ จะมีเนื้อสารกรดแกลลิกดังนี้

สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในหลอดทดลองจะมีสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (0.1 มิลลิลิตร) เพราะฉะนั้นในหลอดทดลองนี้จะมีเนื้อสารกรดแกลลิกเท่ากับ

$$\text{สารละลายปริมาตร 1 ml} \quad \text{มีเนื้อสารกรดแกลลิก} \quad 1,000 \mu\text{g}$$

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น สารละลายปริมาตร 0.1 ml} \quad \text{มีเนื้อสารกรดแกลลิก} \quad & 0.1 \times 1000 \mu\text{g} / 1 \text{ ml} \\ & = 100 \mu\text{g} \end{aligned}$$

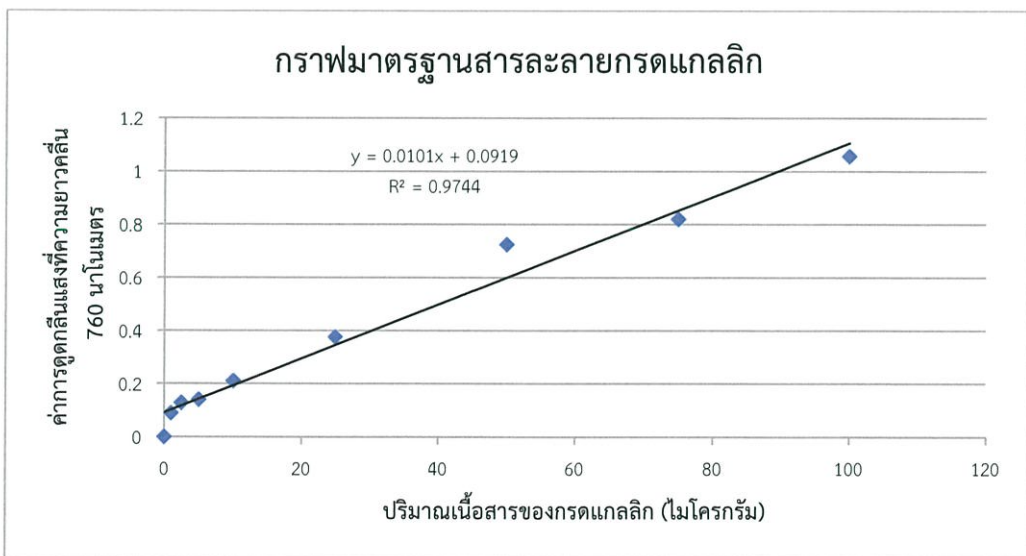
สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในหลอดทดลองจะมีสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (0.1 มิลลิลิตร) เพราะฉะนั้นในหลอดทดลองนี้จะมีเนื้อสารกรดแกลลิกเท่ากับ

$$\text{สารละลายปริมาตร 1 ml} \quad \text{มีเนื้อสารกรดแกลลิก} \quad 750 \mu\text{g}$$

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น สารละลายปริมาตร 0.1 ml} \quad \text{มีเนื้อสารกรดแกลลิก} \quad & 0.1 \text{ ml} \times 750 \mu\text{g} / 1 \text{ ml} \\ & = 75 \mu\text{g} \end{aligned}$$

ดังนั้นสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1,000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจะปิเปตใช้ในการทดลองปริมาตร 100 ไมโครลิตร จึงมีเนื้อสารของกรดแกลลิกอยู่ในแต่ละหลอดทดลองเท่ากับ 100, 75, 50, 25, 10, 5, 2.5 และ 1 ไมโครกรัมตามลำดับ จากนั้นทำการพลอตกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร กับปริมาณเนื้อสารของกรดแกลลิกในหน่วยไมโครกรัมได้ดังนี้



รูปที่ ๑.4 กราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิกสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร กับปริมาณเนื้อสารของกรดแกลลิกในหน่วยไมโครกรัม (ซ้ำที่ 1)

ตัวอย่างที่ ๓.3 การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของน้ำมันหอมระเหยว่านน้ำ (ซ้ำที่ 1) โดยนำเอาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ของน้ำมันหอมระเหยว่านน้ำมาแทนค่า y ในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิกดังนี้

น้ำมันหอมระเหยว่านน้ำมีค่า A_{760} เท่ากับ 0.325

จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิก

$$y = 0.0101x + 0.0919$$

เมื่อ x คือปริมาณเนื้อสารของกรดแกลลิก (ไมโครกรัม)

y คือค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

$$\text{แทนค่า} \quad 0.325 = 0.0101x + 0.0919$$

$$x = 0.325 - 0.0919 / 0.0101$$

$$= 23.079 \mu\text{g}$$

โดยในการทดลองจะใช้น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (0.1 มิลลิลิตร) เพราะฉะนั้นในหลอดทดลองจะมีปริมาณเนื้อสารของน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ

	สารละลายปริมาตร 1 ml	มีน้ำมันหอมระเหย	1 mg
ดังนั้น	สารละลายปริมาตร 0.1 ml	มีน้ำมันหอมระเหย	$0.1 \text{ ml} \times 1 \text{ mg} / 1 \text{ ml}$
			$= 0.1 \text{ mg}$

โดยน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตใช้ในการทดลองปริมาตร 100 ไมโครลิตร จะมีน้ำมันหอมระเหยอยู่ 0.1 มิลลิกรัม ซึ่งจะรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย

ดังนั้นปริมาณฟีนอลิกในน้ำมันหอมระเหย 0.1 mg มีปริมาณเนื้อสารของกรดแกลลิกเท่ากับ 23.079 μg

ถ้า น้ำมันหอมระเหย 1 mg มีปริมาณเนื้อสารของกรดแกลลิก

$$1 \text{ mg} \times 23.079 \mu\text{g} / 0.1 \text{ mg} = 230.79 \mu\text{g}/\text{mg}$$

ถ้าน้ำมันหอมระเหย 1 g มีปริมาณเนื้อสารของกรดแกลลิก

$$1000 \text{ mg} \times 23.079 \text{ } \mu\text{g} / 0.1 \text{ mg} = 230,790 \text{ } \mu\text{g/g}$$

$$230790 / 1000 = 230.79 \text{ mg/g}$$

เพราะฉะนั้น น้ำมันหอมระเหยว่านน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 230.79 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย

5. การคำนวณสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด สารละลายมาตรฐานที่ใช้คือคาเทชินที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1,000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองแบบเดียวกับน้ำมันหอมระเหย ซึ่งในวิธีการทดลองจะใช้สารละลายมาตรฐานคาเทชินที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เพราะฉะนั้นในหลอดทดลองของสารละลายมาตรฐานคาเทชินที่ความเข้มข้นต่างๆ จะมีเนื้อสารของคาเทชิน ดังนี้

สารละลายมาตรฐานคาเทชินที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในหลอดทดลองจะมีสารละลายมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ปริมาตร 250 ไมโครลิตร (0.25 มิลลิลิตร) เพราะฉะนั้นในหลอดทดลองนี้จะมีเนื้อสารคาเทชินเท่ากับ

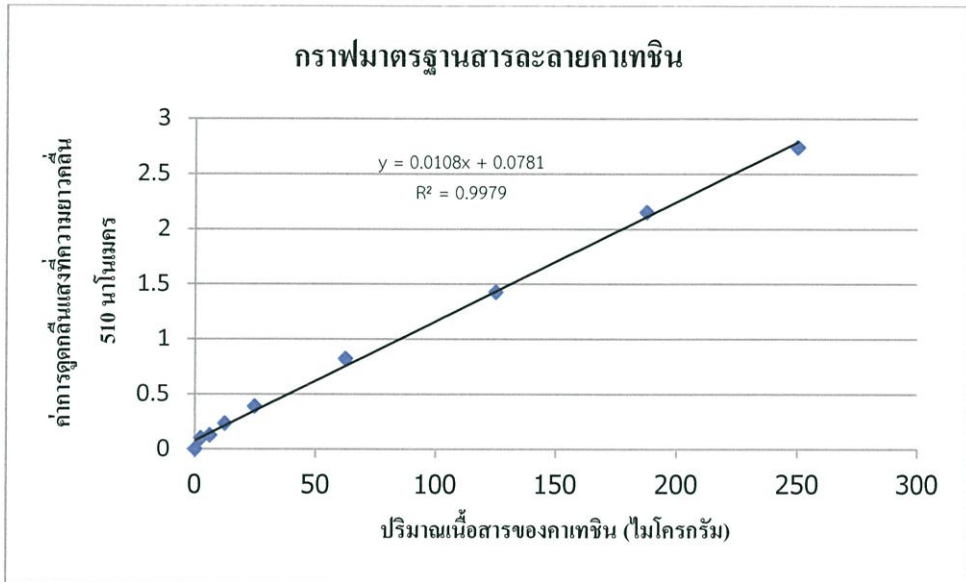
สารละลายปริมาตร 1 ml	มีเนื้อสารคาเทชิน	1,000 μg
ดังนั้น สารละลายปริมาตร 0.25 ml	มีเนื้อสารคาเทชิน	$0.25 \text{ ml} \times 1000 \text{ } \mu\text{g} / 1 \text{ ml}$
		$= 250 \text{ } \mu\text{g}$

สารละลายมาตรฐานคาเทชินที่ความเข้มข้น 750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในหลอดทดลองจะมีสารละลายมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ปริมาตร 250 ไมโครลิตร (0.25 มิลลิลิตร) เพราะฉะนั้นในหลอดทดลองนี้จะมีเนื้อสารคาเทชินเท่ากับ

สารละลายปริมาตร 1 ml	มีเนื้อสารคาเทชิน	750 μg
ดังนั้น สารละลายปริมาตร 0.25 ml	มีเนื้อสารคาเทชิน	$0.25 \text{ ml} \times 750 \text{ } \mu\text{g} / 1 \text{ ml}$
		$= 187.5 \text{ } \mu\text{g}$

ดังนั้นสารละลายมาตรฐานคาเทชินที่ความเข้มข้น 1,000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจะปิเปตใช้ในการทดลองปริมาตร 250 ไมโครลิตร จึงมีเนื้อสารของคาเทชินอยู่ในแต่ละหลอดทดลองเท่ากับ 250, 187.5, 125, 62.5, 25, 12.5, 6.25 และ 2.5 ไมโครกรัม ตามลำดับ จากนั้นทำการพลอตกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร กับปริมาณเนื้อสารของคาเทชินในหน่วยไมโครกรัมได้ดังนี้



รูปที่ ๑.5 กราฟมาตรฐานสารละลายคาเทชินสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร กับปริมาณเนื้อสารของคาเทชินในหน่วยไมโครกรัม (ซ้ำที่ 1)

ตัวอย่างที่ ๑.4 การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของน้ำมันหอมระเหยว่านน้ำ (ซ้ำที่ 1) โดยนำเอาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ของน้ำมันหอมระเหยว่านน้ำ มาแทนค่า y ในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสารละลายคาเทชินดังนี้

น้ำมันหอมระเหยว่านน้ำมีค่า A_{510} เท่ากับ 0.092

จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสารละลายคาเทชิน

$$y = 0.0108x + 0.0781$$

เมื่อ x คือปริมาณเนื้อสารของคาเทชิน (ไมโครกรัม)

y คือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

$$\text{แทนค่า} \quad 0.092 = 0.0108x + 0.0781$$

$$x = 0.092 - 0.0781 / 0.0108$$

$$= 1.287 \mu\text{g}$$

โดยในการทดลองจะใช้น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 250 ไมโครลิตร (0.25 มิลลิลิตร) เพราะฉะนั้นในหลอดทดลองจะมีปริมาณเนื้อสารของน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ

	สารละลายปริมาตร 1 ml	มีน้ำในหอมระเหย	1 mg
ดังนั้น	สารละลายปริมาตร 0.25 ml	มีน้ำในหอมระเหย	$0.25 \text{ ml} \times 1 \text{ mg} / 1 \text{ ml}$
			$= 0.25 \text{ mg}$

โดยน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปีเปตใช้ในการทดลองปริมาตร 250 ไมโครลิตร จะมีน้ำมันหอมระเหยอยู่ 0.25 มิลลิกรัม ซึ่งจะรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของคาเทชินต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย

ดังนั้นปริมาณฟลาโวนอยด์ในน้ำมันหอมระเหย 0.25 mg มีปริมาณเนื้อสารของคาเทชินเท่ากับ 1.287 μg

ถ้าน้ำมันหอมระเหย 1 mg มีปริมาณเนื้อสารของคาเทชิน

$$1 \text{ mg} \times 1.287 \mu\text{g} / 0.25 \text{ mg} = 5.148 \mu\text{g}/\text{mg}$$

ถ้าน้ำมันหอมระเหย 1 g มีปริมาณเนื้อสารของคาเทชิน

$$1000 \text{ mg} \times 1.287 \mu\text{g} / 0.25 \text{ mg} = 5148 \mu\text{g}/\text{g}$$

$$5148 / 1000 = 5.148 \text{ mg}/\text{g}$$

เพราะฉะนั้น น้ำมันหอมระเหยว่าน้ำมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 5.148 มิลลิกรัมของคาเทชินต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย