# ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากดอกกระดังงาสงขลาก่อนลนไฟและหลังลนไฟ

**มาลินี เบ็ญพาด**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

# ANTIOXIDANT ACTIVITY AND CHEMICAL COMPOUNDS OF THE ESSENTIAL OILS FROM PREDISTILLED AND POSTDISTILLED DRAW YLANG-YLANG FLOWER

**MALINEE BENPHAT**

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements

For Master of Science in Thai Pharmacy

Academic Year 2019

Copyright of Bansomdejchaopraya Rajabhat University

| | |
|---|---|
| ชื่อเรื่อง | ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบทางเคมีของของน้ำมันหอมระเหยจากดอกกระดังงาสงขลาก่อนลนไฟและหลังลนไฟ |
| ชื่อผู้วิจัย | มาลินี เบ็ญพาด |
| สาขาวิชา | เภสัชกรรมไทย |
| อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา แก้วน้อย |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | อาจารย์สุชาดา มานอก |

---

มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย

.....  คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร.คณกร สว่างเจริญ)

**คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์**

.....  ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.ผ่องพรรณ ศิริพงษ์)

.....  กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา แก้วน้อย)

.....  กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์)

.....  กรรมการ

(อาจารย์สุชาดา มานอก)

.....  กรรมการและเลขานุการ

(อาจารย์สุภรัตน์ ควนใหญ่)

**ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา**

**ชื่อเรื่อง** **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากดอกกระดังงาสงขลาก่อนลนไฟและหลังลนไฟ**
**ชื่อผู้วิจัย** **มาลินี เบ็ญพาด**
**สาขาวิชา** **เภสัชกรรมไทย**
**อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก** **ผู้ช่วยศาสาตราจารย์ ดร.อัจฉรา แก้วน้อย**
**อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม** **ผู้ช่วยศาสาตราจารย์ ดร.อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์**
**อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม** **อาจารย์ศุภรัตน์ ดวนใหญ่**
**ปีการศึกษา** **2562**

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากดอกกระดังงาสงขลา *Cananga odorata* (Lam.) Hook.F.&Thomson var.fruticosa (Craib)J.Sinclair ก่อนลนไฟและหลังลนไฟด้วยวิธี DPPH assay วิเคราะห์สารประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีและแมสสเปกโทสโกปีและทดสอบฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอมส์ (Ames test) จากการตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ผลพบว่า น้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาที่ไม่ผ่านการลนไฟมีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ $IC_{50}$ = 1,239.54 ± 48.81 ppm ซึ่งมากกว่าน้ำมันหอมระเหยดอกกระดังงาสงขลาลนไฟที่ มีค่า $IC_{50}$ = 7,937.77 ± 375.34 ppm จากการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีและแมสสเปกโทสโกฟีพบว่า น้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาที่ไม่ผ่านการลนไฟ มีสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ $\beta$ – Caryophylene 14.10%, $\alpha$ - Copaene 9.0%, Humulene 5.32%, Eugenol 3.09%, linalool 2.34% ส่วนกระดังงาสงขลาลนไฟมีสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ $\alpha$ – Pinene 81.15%, Cyclopentanal 1.59%, D - Limenene 0.11%, $\alpha$ – Ocimene 0.10% จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยวิธีเอมส์ (Ames test) ของน้ำมันหอมระเหยจากทั้ง 2 ตัวอย่าง พบว่า กระดังงาสงขลาก่อนลนไฟและหลังลนไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 100 ซึ่งการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่บ่งชี้ให้เห็นถึงความปลอดภัยของกระดังงาสงขลาก่อนลนไฟและหลังลนไฟ

**คำสำคัญ :** กระดังงาสงขลา, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, น้ำมันหอมระเหย, การลนไฟ

| | |
|---|---|
| **Title** | **Antioxidant Activity and Chemical Compounds of the Essential Oils from Predistilled and Postdistilled Draw Ylang-ylang Flower** |
| **Author** | **Malinee Benbhat** |
| **Program** | **Thai Pharmacy** |
| **Major Advisor** | **Assistant Professor Dr.Atchara Keawnoi** |
| **Co-Advisor** | **Assistant Professor Dr.Arun Chanchaycheawwiwathna** |
| **Co-Advisor** | **Suparat Duanyai** |
| **Academic Year** | **2019** |


**ABSTRACT**

The aim of this research was to study the antioxidant activity of the essential oils from predistilled and postdistilled Draw Ylung-Ylung (*Cananga odorata*(Lam.) Hook.F.&Thomson var.fruticosa (Craib)J.Sinclair) using DPPH assay. The chemical compositions of the essential oils were analyzed by using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) and antimutagenic activity was tested by using Ames test. The results of DPPH assay indicated that the essential oils from predistilled Draw Ylung-ylung had higher antioxidant activity with the relative peak areas of $IC_{50}$ = 1,239.54 ± 48.81 ppm than that from postdistilled one which had the relative peak areas of $IC_{50}$= 7,937.77 ± 375.34 ppm. The results of GC-MS analysis showed that the essential oils from predistilled Draw Ylang-ylang contained 14.10% β-Caryophylene, 9.00% α-Copaene, 5.32% Humulene, 3.09% Eugenol, and 2.34% linalool; and the essential oils from postdistilled Draw Ylang-ylang contained 81.15% α–Pinene, 1.59% Cyclopentanal, 0.11% D-Limenene, and 0.10% α–Ocimene. The results of the direct mutagenic potential with the Ames test of the essential oils of predistilled and postdistilled Draw Ylang-ylang on the bacteria tester strain *Salmonella typhimurium* TA100 showed no mutagenesis to *S. typhimurium* TA100. This research provides preliminary data indicating the safety of predistilled and postdistilled Draw Ylang-ylang.


**Keywords**: Draw Ylang-ylang Flower, Antioxidant Activity, Essential Oil, Distillation

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเพราะความกรุณาอย่างยิ่งจาก อาจารย์ ดร.อัจฉรา แก้วน้อย ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และอาจารย์ศุภรัตน์ ดวนใหญ่ ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้ ชี้แนะแนวทางที่มีประโยชน์ต่อการดำเนินงานวิจัยและปลูกฝังพฤติกรรมที่ดีงามในการทำวิจัยและการทำงานให้แก่ผู้วิจัยด้วยความเอาใจใส่และห่วงใยตลอดมา ชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหา เป็นกำลังใจและเป็นแบบอย่างที่ดีแก่ผู้วิจัยเสมอมาโดยตลอด ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ผ่องพรรณ ศิริพงษ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ ดร.อัจฉรา แก้วน้อย อาจารย์สุชาดา มานอก กรรมการสอบวิทยานิพนธ์และอาจารย์ศุภรัตน์ ดวนใหญ่ กรรมการและเลขานุการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาในครั้งนี้ ขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณบิดามารดาและน้องสาว ที่ช่วยหาสมุนไพร มากลั่นน้ำมันหอมระเหยและเป็นกำลังใจห่วงใยให้กับผู้วิจัยโดยตลอด

ขอขอบพระคุณสาขาวิชาเภสัชกรรมไทยและสาขาวิชาการแพทย์แผนไทยที่ให้ใช้อุปกรณ์ในการทำวิทยานิพนธ์

มาลินี เบ็ญพาด

# สารบัญ

หน้า


**บทคัดย่อภาษาไทย**..... ก

**บทคัดย่อภาษาอังกฤษ**..... ข

**กิตติกรรมประกาศ**..... ค

**สารบัญ**..... ง

**สารบัญตาราง**..... ฉ

**สารบัญภาพ**..... ช

**บทที่ 1 บทนำ**..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

ขอบเขตของการวิจัย..... 2

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย..... 2

นิยามศัพท์เฉพาะ..... 2

กรอบแนวคิดในการวิจัย..... 3

**บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**..... 4

อนุมูลอิสระ )Free Radicals(..... 4

สารต้านอนุมูลอิสระ)Antioxidant(..... 5

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant Activity Determination)..... 6

การวิเคราะห์องค์ประกอบเคมี..... 8

การกลายพันธุ์..... 9

สมุนไพรไทยที่ใช้ในงานวิจัย..... 10

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 11

**บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย**..... 14

เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 14

ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย..... 15

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ..... 15

สารละลายที่ใช้การงานวิจัย..... 15

วิธีการทดลอง..... 16

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

**บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลงานวิจัย**..... 20
ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยของสมุนไพรไทย 2 ตัวอย่าง..... 20
ผลทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของน้ำมันหอมระเหยของสมุนไพรไทย
2 ตัวอย่าง..... 20
ผลการทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย..... 22
ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ-แมสสเปกโทรมิเตอร์..... 26
ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยวิธีเอมส์ )Ames Test( ..... 29
**บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ**..... 32
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย..... 32
ข้อเสนอแนะ..... 33
**บรรณานุกรม**..... 34
**ภาคผนวก**..... 36
ภาคผนวก ก ภาพสมุนไพร 2 ชนิด..... 37
ภาคผนวก ข ภาพทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยวิธีเอมส์ )Ames Test(..... 39
ภาคผนวก ค สำเนาประกาศนียบัตร..... 42
**ประวัติผู้วิจัย**..... 44

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | กรอบแนวคิดในการวิจัย..... | 3 |
| 2 | รายชื่อสมุนไพรไทยที่นำมาทำการทดลอง..... | 15 |
| 3 | ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากสมุนไพรไทย 2 ตัวอย่าง..... | 20 |
| 4 | ผลการต้านอนุมูลอิสระจากน้ำมันหอมระเหยของสมุนไพรไทย 2 ตัวอย่าง..... | 21 |
| 5 | ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก..... | 23 |
| 6 | ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรที่สกัดด้วยน้ำ..... | 24 |
| 7 | ผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระที่สามารถลดอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง (IC50) ของสารสกัดสมุนไพร ทั้ง 2 ตัวอย่าง ที่สกัดด้วยน้ำ..... | 26 |
| 8 | แสดงองค์ประกอบทางเคมีของกระดังงาสงขลา..... | 27 |
| 9 | แสดงองค์ประกอบทางเคมีของกระดังงาสงขลาณไฟ..... | 29 |
| 10 | แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอมส์โดยใช้แบคทีเรีย S.typhimurium TA100..... | 30 |

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | สมการการเกิดปฏิกิริยาหลังจากการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ..... | 7 |
| 2 | ดังในภาพที่ 1, 2 และ 3 แสดง Pattern ของ Chromatogram ของ Essential oil ของ (1) กระดังงาสงขลา (2) กระดังงาสงขลาหลังลนไฟ..... | 22 |
| 3 | กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซี..... | 23 |
| 4 | กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลา..... | 25 |
| 5 | กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาลนไฟ..... | 25 |
| 6 | โครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลา..... | 27 |
| 7 | โครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาลนไฟ..... | 28 |
| 8 | กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลากับจำนวน TA100 Revertants..... | 30 |
| 9 | กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาลนไฟกับจำนวน TA100 Revertants..... | 31 |

# บทที่ 1
# บทนำ

## ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กระดังงาสงขลา *Cananga odorata* (Lam.) Hook.F. & Thomson var.fruticosa (Craib) J.Sinclair เป็นพรรณไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในภาคใต้ของประเทศไทย อินโดนีเซียและมาเลเซีย เป็นพืชตระกูลเดียวกับกระดังงาไทย (พัฒน์ พิชาน, 2547) เป็นพืชสมุนไพรที่มีลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ออกดอกตลอดปี ดอกเก็บเกี่ยวได้ง่าย สามารถปลูกได้ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย การใช้ประโยชน์ ใช้ดอกแทนดอกกระดังงาไทยในการปรุงเป็นยาหอม บำรุงหัวใจ บำรุงธาตุ บำรุงโลหิต แก้ลมวิงเวียน (กาญจนา เชียงทอง, 2546) น้ำมันหอมระเหยจากกระดังงาสงขลาโดยมากเป็นนิยมนำมาเป็นส่วนผสมที่สำคัญในผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำหอม เช่น น้ำหอม ครีม โลชั่น สบู่และผงซักฟอก ในน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลามีองค์ประกอบหลัก คือ humulene, germacrene D, (E, E) - α - farnesene, (E, E) -farnesol และ benzyl benzoate (Phan Minh Giang and Phan Tong Son, 2016) น้ำมันหอมระเหยจากดอกกระดังงาสงขลา มีฤทธิ์ยับยั้งในการเจริญของ *E. coli* (กาญจนา ภิณโญภาพ, 2551, น.3) และมีการนำกระดังงามาลนไฟก่อนที่จะนำมาเป็นเครื่องปรุงขนมไทย (ศรีสมร คงพันธุ์และคณะ, 2543) ใช้ดอกแก่จัด โดยเอากลีบดอกนำไป ลนไฟเพื่อต้องการให้กระดังงาช้ำ เมื่อกระดังงาช้ำจึงจะมีกลิ่นหอม ซึ่งการลนไฟนิยมทำให้ช้ำ โดยเปลวเทียน (ศรีสมร คงพันธุ์และมณี สุวรรณผ่อง, 2531) เป็นเกร็ดและเคล็ดลับการทำขนมไทยที่ขาดเสียมิได้ เพื่อให้เกิดกลิ่นหอมยิ่งขึ้น ทำให้น่ารับประทาน จึงนำดอกกระดังงาเข้ามาเป็นส่วนประกอบในการทำขนม (วรนิธิ์ สมุทรวนิช, 2539) ตัวอย่างเช่น การลอย นำดอกกระดังงาทั้งดอกค่อยๆ ลนจนทั่ว แล้วบีบที่กระเปาะ ให้กลีบลนลงในน้ำ เป็นต้น (จริยา เดชกุญชร, 2549) อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลที่ชัดเจนของชนิดสาร ความปลอดภัยในการนำไปใช้ และกรรมวิธีที่เหมาะสมในการลนไฟ เพื่อให้ได้น้ำมันหอมระเหย ในปริมาณที่มากงาน ดังนั้นวิจัยนี้ จึงศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากดอกกระดังงาสงขลาก่อนลนไฟและหลังลนไฟและวิเคราะห์สารประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีและแมสสเปกโทสโกฟีและวิเคราะห์ฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์

## วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากดอกกระดังงาสงขลา ก่อนลนไฟและหลังลนไฟ

2. เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของมันหอมระเหยจากดอกกระดังงาสงขลา ก่อนลนไฟและหลังลนไฟโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟปี

3. เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของน้ำมันหอมระเหยจากกระดังงาสงขลา ก่อนลนไฟและหลังลนไฟ

## ขอบเขตของการวิจัย

ทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาก่อนลนไฟและหลังลนไฟ ด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยที่ได้มาทำการตรวจสอบทางคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ของสารต้านอนุมูลอิสระ วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีและแมสสเปกโทสโกปีและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของน้ำมันหอมระเหยจากกระดังงาสงขลา ก่อนลนไฟและหลังลนไฟ

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้ทราบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของกระดังงาสงขลา ก่อนลนไฟและหลังลนไฟ

2. ได้ทราบองค์ประกอบสารเคมีของกระดังงาสงขลา ก่อนลนไฟและหลังลนไฟ

3. ได้ทราบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของน้ำมันหอมระเหยจากกระดังงาสงขลา ก่อนลนไฟและหลังลนไฟ

## นิยามศัพท์

**น้ำมันหอมระเหย (Essential Oil)** หมายถึง น้ำมันที่พืชสร้างขึ้นและเก็บไว้ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ดอก ใบ ผล ลำต้น ตลอดจนเมล็ดซึ่งจะพบแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด คุณสมบัติที่เด่นชัด คือ มีกลิ่นหอมและระเหยง่ายที่อุณหภูมิปกติ และเป็นของเหลวใสที่ไม่มีสีหรือมีสีอ่อน มีกลิ่นเฉพาะ

**การกลายพันธุ์ (Mutation)** หมายถึง ดีเอ็นเอที่มีความผิดปกติไปจากเดิมเมื่อถูกนำไปถ่ายทอดรหัส ซึ่งแบบผิดปกติ ทำให้สิ่งที่ผิดปกติไปจากธรรมชาติ ดีเอ็นเอที่ผิดปกติจะมีเบสใดเบสหนึ่งในสายดีเอ็นเอถูกเปลี่ยนแปลงมีความแตกต่างจากเดิม

**องค์ประกอบทางเคมีในสมุนไพร** หมายถึง สารอินทรีย์ในสมุนไพรบางชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

**ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ** หมายถึง คุณสมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical)

**IC50 (Inhibition Concentrate)** หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ ซึ่งสามารถทำการยับยั้งไม่ให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระร้อยละ 50

## กรอบแนวคิดในการวิจัย

**ตารางที่ 1 กรอบแนวคิดในการวิจัย**

| ปัจจัยนำเข้า | กระบวนการศึกษา | ผลลัพธ์ |
|---|---|---|
| - น้ำมันหอมระเหยจากกระดังงาสงขลามีรายงานวิจัยมาก่อนแล้วว่าสามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้<br>- กระดังงาสงขลาได้มาจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน | 1. ทำการตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระของกระดังงาสงขลา ก่อนลนไฟและหลังลนไฟ<br>2. ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยของกระดังงาสงขลาก่อนลนไฟและหลังลนไฟด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีและแมสสเปกโทสโกปี<br>3. ทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของน้ำมันหอมระเหยจากกระดังงาสงขลา ก่อนลนไฟและหลังลนไฟ | 1. ได้ทราบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของกระดังงาสงขลา ก่อนลนไฟและหลังลนไฟ<br>2. ได้ทราบองค์ประกอบสารเคมีของกระดังงาสงขลา ก่อนลนไฟและหลังลนไฟ<br>3. ได้ทราบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของน้ำมันหอมระเหยจากกระดังงาสงขลา ก่อนลนไฟและหลังลนไฟ เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่บงชี้ให้เห็นถึงความปลอดภัยของกระดังงาสงขลาก่อนลนไฟและหลังลนไฟ |

# บทที่ 2
# เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บทนี้กล่าวถึงข้อมูลสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัยความหมายของสารอนุมูลอิสระสารต้านอนุมูลอิสระ และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังหัวข้อต่อไปนี้

1. อนุมูลอิสระ
2 สารต้านอนุมูลอิสระ
3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
4. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี
5. การกลายพันธุ์
6. สมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย
7. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

**อนุมูลอิสระ (Free Radicals)**

อนุมูลอิสระ (Free Radical) หมายถึง อะตอมโมเลกุลหรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดซึ่งมีระดับพลังงานสูงมีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่างกายโดยการดึงอิเล็กตรอนของโมเลกุลอื่นมาแทนที่โมเลกุลที่ขาดหายไป เพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา ส่งผลให้ร่างกายขาดความสมดุลโดยการทำลายองค์ประกอบหลักของเซลล์ ทั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ลิพิด โปรตีนไขมัน คาร์โบไฮเดรต เอ็นไซม์ ดีเอ็นเอ เซลล์เมมเบรน ไมโตรคอนเดรีย คอลลาเจนและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ที่เป็นสาเหตุทำให้สารชีวโมเลกุลพวกนี้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้เสียหน้าที่การทำงาน ทำให้เซลล์ตาย การเกิดการกลายพันธุของดีเอ็นเอในเซลล์และก่อให้เกิดอาการและพยาธิสภาพต่างๆ ได้ เช่น มะเร็ง หลอดเลือดหัวใจ พากินสัน อัลไซเมอร์ ข้ออักเสบ ภูมิแพ้และโรคต้อกระจก เป็นต้น นอกจากจะเกิดภายในสิ่งมีชีวิตแล้วอนุมูลอิสระยังสามารถเกิดจากภายนอกสิ่งมีชีวิตหรือสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การได้รับเชื้อโรค เช่นการติดเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อไวรัส โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (Immune Diseases) เช่น รูมาตอยด์ ข้ออักเสบ เป็นต้น จากมลภาวะ เช่น ควันบุหรี่ ควันจากแก๊สท่อไอเสีย เช่น ไนตรัสออกไซด์ ไนไตรเจนไดออกไซด์ อนุมูลอิสระและสารต่างๆ ในทางชีววิทยาที่สามารถเป็นตัวตั้งต้นทำให้เกิด เป็นอนุมูลอิสระ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive Nitrogen Species; RNS) กลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive Chlorine Species; RCS) และกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive Oxygen Species; ROS)

อนุมูลอิสระที่สำคัญที่สุดที่เกิดในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ Oxygen Radical, อนุพันธ์ของ Oxygen Radical (เช่น Hydroxyl Radical และ Superoxide Radical), Transition Metals (โลหะแทรนซิชัน), Hydrogen Peroxide, Carbonate Radical ($CO_3$), Nitrate Radical ($NO_3$), Superoxide Radical ($O_2$), Methyl Radical ($CH_3$), Reactive Oxygenspecies (ROS), Peroxyl Radical (ROO) เป็นต้น (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

## สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันชะลอหรือยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (เจนจิรา จิรัมย์และประสงค์ สีหานาม, 2554) โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์ป้องกันการทำลายเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระซึ่งประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดโดยทำหน้าที่แตกต่างกัน มีทั้งที่เป็นเอนไซม์ ไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบละลายในน้ำ สารประกอบละลายในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระจำพวกนี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ ตัวอย่าง เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (Radical Scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (Singlet Oxygen Quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Metal Chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (Chain-Breaking) เสริมฤทธิ์ (Synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme Inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

**กลไกการต้านอนุมูลอิสระ**

แบ่งเป็น 2 กลไกตามลักษณะการออกฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ

1. ฤทธิ์ป้องกันอนุมูลอิสระ (Preventive Antioxidant Activity) สารต้านอนุมูลอิสระนี้ป้องกันอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น ทำการยับยั้งไม่ให้เกิดอนุมูลที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์การคีเลตโลหะทรานสิชัน ช่วยระงับการเกิดสารความไวสูง (Reactive Species; RS) โดยสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์ โปรตีนในร่างกายที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น CAT, GPx, GSH หมายรวมถึงสารจำพวกกลุ่มแคโรทีนและวิตามินอี

2. ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ (Free–Radical Scavenging Antioxidant) สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มนี้จะหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มนี้ ได้แก่ วิตามินซีแอลบูมินบิลิรูบินแคโรทีนอยด์ ยูบิควิโนน (CoQ10) และฟลาโวนอยด์

**แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ**

มี 2 แหล่ง ได้แก่

1. สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic Antioxidant) สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากการกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีโดยส่วนใหญ่จะออกแบบให้มีโมเลกุลขนาดเล็กการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่นสีและรสชาติ

เปลี่ยนแปลงนี้มีสภาพคงตัวกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติแต่มีข้อจำกัดในด้านของความปลอดภัยในการบริโภคตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ดังนี้ (โอภา วัชระคุปต์และคณะ, 2550)

โทลอกซ์ (Trolox) มีสูตรโมเลกุลทางเคมี คือ $C_{14}H_{18}O_4$ ที่เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีซึ่งดัดแปลงโครงสร้างโดยเปลี่ยนสายอัลเคนกลายเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก มีสูตรโครงสร้างที่ทำให้มีความสามารถในการละลายได้ดีในน้ำเนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำได้ดีจึงทำให้การออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอีโดยที่วิตามินอี ต้องใช้เวลานานเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน ขณะที่โทลอกซ์ (Trolox) ออกฤทธิ์เกือบจะทันทีในวิธีการตรวจสอบ หลายวิธีที่การวิจัยนิยมใช้โทลอกซ์ (Trolox) เป็นสารมาตรฐานในการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

กรดแกลลิก (Gallic Acid) เป็นสารประกอบอินทรีย์มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_7H_6O_5$ Gallic Acid ที่เป็นส่วนประกอบของแทนนินและพบมากในองุ่น ใบชา เปลือกไม้โอ๊คและพืชอื่นๆ โดยทั่วไปจะใช้ในอุตสาหกรรมทางยา กรดแกลลิก (Gallic Acid) มีคุณสมบัติของคือ สามารถยับยั้งเชื้อไวรัส เชื้อราและมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดี

กรดเอทิลีนไดอามีนเตตราอาเซติก (EDTA) มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารคีเลต โดยจับกับธาตุโลหะที่มีประจุ เช่น เหล็ก ตะกั่ว แคดเมียม สังกะสี ทองแดง และแมงกานีส ซึ่งทางการแพทย์นำมาใช้กำจัดไอออนของโลหะต่างๆได้

2.สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ (Natural Antioxidant) คือ สารประกอบที่ได้จากพืชหรือสัตว์ ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้แก่ โทโคฟีรอล (Tocopherol), โทโคไตรอีนอล (Trocotrienol), แคโรทีนอยด์ (Carotenoid), กรดแอส์บิก (Ascorbic Acid), สารพอลิฟีนอล (Polyphenol) สารต้านอนุมูลอิสระจากเอนไซม์ เช่น กลูโคสออกซิเดส (Glucose Oxidant) คะตะเลส (Catalase; CAT) เป็นต้น

## การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant Activity Determination) คือ การตรวจสอบเพื่อแสดงสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถตรวจสอบได้หลายวิธี ดังนี้

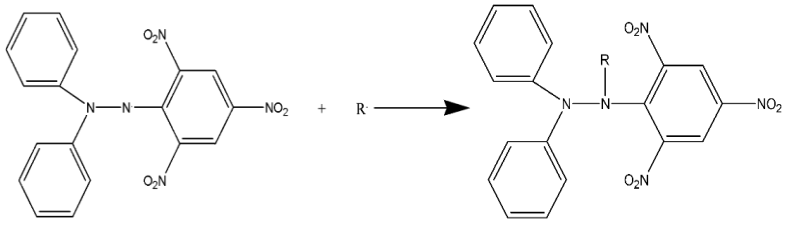
**วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ**

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพเป็นการทดสอบเพื่อหาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่างโดยอาศัยหลักการต่างๆ เช่น การทำให้เกิดสีการทำให้เกิดตะกอน ความสามารถของการละลายในตัวทำละลายและการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยม ได้แก่ การตรวจวัดสารโพลีฟีนอลชนิดต่างๆ (เช่น Shinoda Test และ Pew Test) โครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography; TLC) และการตรวจหาสารต้าน

อนุมูลอิสระชนิดต่างๆ โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

**การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH)**

DPPH Radical Scavenging Assay เป็นวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นซึ่งยอมให้สารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ DPPH (1,1-dipheny1-2-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร มีสีม่วง เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระค่าดูดกลืนแสงของดีพีพีเอช จะลดลงเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลของสารต้านอนุมูลอิสระและอนุมูลอิสระ โดยที่อนุมูลอิสระจะได้รับไฮโดรเจนอะตอมสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีและปฏิกิริยาจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ดังภาพที่ 1




ดีพีพีเอช (สีม่วง) สารต้านอนุมูลอิสระ ดีพีพีเอช (สีเหลือง)

**ภาพที่ 1 สมการการเกิดปฏิกิริยาหลังจากการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ**

ข้อดีวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวกและรวดเร็ว

ข้อเสียวิธีนี้ คือ ดีพีพีเอช ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า จึงทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง ต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ (บังอร วงศ์รักษ์และศศิลักษณ์ ปิยะสวรรณ์, 2549)

**การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารโพลีฟีนอลด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง** (Thin Layer Chromatohraphy; TLC) คือ เทคนิคที่ใช้ในการแยกสารด้วยตัวพาหรือตัวทำละลาย (Mobile Phase) กับการถูกดูดซับ (Absorbent หรือ Stationary Phase) ที่อัตราการเคลื่อนของสารตัวอย่างบนตัวดูดซับขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารตัวอย่างกับตัวทำละลายและความสามารถการดูดซับของตัวดูดซับที่มีต่อสารตัวอย่างของแต่ละชนิด สารตัวอย่างที่แตกต่างกันจะถูกละลายและถูกดูดซับได้ไม่เท่ากัน ซึ่งสารที่ละลายในตัวทำละลายได้ดีและถูกดูดซับน้อยจะเคลื่อนที่ได้เร็ว ค่า $R_f$ เข้าใกล้ 1.0 ($R_f$ ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่/ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่) ส่วนสารที่ละลายในตัวทำละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ช้า ค่า $R_f$ จะเข้าใกล้ 0 ตัวดูดซับที่นิยมใช้ คือ ซิลิกาเจลและตัวทำละลายหรือตัวพานำมาใช้ในการแยกสารมีด้วยกัน

หลายชนิด โดยมีการใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวหรือหลายชนิดผสมกันเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีที่สุด เช่น น้ำ เอทานอล เมทานอล เอทิลอะซิเทต กรดฟอร์มิก คลอโรฟอร์ม สารตัวอย่างบางชนิดสามารถแยกโดยใช้ TLC แล้วสามารถมองเห็นสีได้ด้วยตาเปล่า ได้แก่ แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ชาลโคน (Chalcone) และออโรน (Ourone) แต่บางชนิดต้องนำแผ่น TLC ไปทำปฏิกิริยาต่อกับไอของแอมโมเนียหรือทำการส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) หรือฉีดด้วยสารต่างๆ เช่น โพลินสารละลายวานิลลินในกรดไฮโดรคลอริก สารละลายวานิลลินในกรดซัลฟูริก สารละลายโพแทสเซียมไอโอเดต สารละลายกิบส์ (Gibbs Reagent) และสารละลาย DPPH

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ใช้สารตัวอย่างในปริมาณที่น้อย วิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกันใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น มีขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน และใช้ต้นทุนต่ำในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ข้อเสียของวิธีนี้ คือ มีความไว และความแม่นยำต่ำ (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2554)

## การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

โครมาโทกราฟี (Chromatograph) หมายถึง วิธีการแยกองค์ประกอบต่างๆ ออกจากกันเป็นวิธีที่ได้ผลดีมากและเป็นนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยการอาศัยความแตกต่างการกระจายตัวของสารตัวอย่างระหว่าง 2 เฟส ที่ไม่ได้มีการผสมของสารรวมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ เฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) อาจเป็นของเหลวหรือแก๊ส ระหว่างอีกเฟสหนึ่ง ซึ่งเป็นฟอสเฟสที่อยู่กับที่ (Stationary Phase) หรือของเหลวที่ล้อมรอบกับวัสดุที่ช่วยพยุง มีหน้าที่แยกสาร แยกองค์ประกอบของสารให้ออกจากกัน ทั้งนี้ได้ขึ้นอยู่กับความจำเพาะเจาะจงของสารตัวอย่างซึ่งมีต่อเฟสที่อยู่กับที่ ประโยชน์ของการทำโครมาโทกราฟีนี้ คือ การแยกสารของแต่ละชนิดออกจากสารผสม โดยตรวจความสม่ำเสมอของสารตัวอย่าง ทำสารให้บริสุทธิ์ โดยตรวจเอกลักษณ์ของสาร ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ และตรวจสารปนเปื้อนของสาร

แก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปคโทเมตรี หมายถึง วิธีที่มีการใช้แก๊สเฉื่อยที่ทำหน้าที่เป็นแก๊สพาเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีความเหมาะสมสำหรับนำมาประยุกต์ใช้แยกสารระเหยได้ง่าย และมีความเสถียรภาพทางความร้อน ซึ่งวิธีนี้สารตัวอย่างถูกนำเข้าสู่ระบบเกิดการระเหยของสารกลายเป็นไอที่จุดฉีดสาร โดยมีการใช้ระบบของคอมพิวเตอร์เป็นตัวควบคุม มีการสื่อสารกับส่วนประกอบต่างๆ โดยรับสัญญาณจากข้อมูลดีเทคเตอร์ตลอดระยะเวลาการประมวลผลและทำการรายงานผลไปใช้ที่เครื่องพิมพ์

แมสสเปกโทรเมตรี คือ วิธีการสำหรับการวิเคราะห์พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบที่ไม่ทราบชื่อชนิดของสาร ใช้ในการศึกษาโครงสร้างของโมเลกุล โดยอาศัยหลักการการเคลื่อนที่ของมวลที่มีการประจุ คือไอออนของสนามไฟฟ้าหรือสนามแม่เหล็กพฤติกรรมการเคลื่อนที่นี้ได้ขึ้นอยู่กับค่าของมวลต่อประจุของไอออน นอกจากนี้การทราบประจุของไอออน ทำให้ได้ทราบค่ามวลของไอออน

การวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีและแมสสเปกโทรเมตรี หมายถึง วิธีการวิเคราะห์หาชนิดของสาร วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณของสารตัวอย่าง คือวิธีร่วมมีข้อดี คือ สามารถการแยกสารของสารผสมกลายเป็นไอได้ง่าย ให้สารแยกออกให้เป็นองค์ประกอบเดี่ยว โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีมีความสามารถการแยกองค์ประกอบได้มีประสิทธิภาพ องค์ประกอบของสารในแต่ละชนิดได้ผ่านการแยกแล้วต้องผ่านการตรวจวัดโดยวิธีแมสสเปกโทรเมตรี ที่มีลักษณะจำเพาะของการตรวจวัดและมีสภาพที่ไวต่อการตรวจวัด ได้ให้ข้อมูลแมสสเปกตรัมในสารที่สามารถทำการพิสูจน์หาเอกลักษณ์ของสารอย่างมีประสิทธิภาพ เป็นการรวมสองวิธีเข้าด้วยกัน ะหว่างแก๊สโครมาโทกราฟี คือ วิธีการแยกของสารกับแมสสเปกโทรเมตรีคือวิธีการตรวจวัดเพื่อพิสูจน์หาเอกลักษณ์ ตรวจหาปริมาณของสาร ซึ่งการรวมสองวิธีนี้ มีข้อดี คือ ทำให้การแยกองค์ประกอบของสารผสมที่มีความซับซ้อนได้ แมสสเปกตรัมของแต่ละองค์ประกอบใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารและให้ข้อมูลในการวิเคราะห์หาปริมาณสารแต่ละชนิดที่ผสมกัน มีสภาพไวในการตรวจวัดสารสูงที่สามารถให้ข้อมูลแมสสเปกตรัมได้อย่างสมบูรณ์ แม้ว่าสารนั้นจะมีปริมาณที่เล็กน้อย ซึ่งให้หลักฐานด้านมวลโมเลกุลของสาร และให้ข้อมูลด้านรูปแบบการแตกโครงสร้างของสารเป็นส่วนย่อย ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของสาร (สุรางค์รัตน์ แดงจิระ, 2558)

## การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ (Mutation) หมายถึง การที่ดีเอ็นเอมีความผิดปกติไปจากเดิมถูกนำไปถ่ายทอดรหัสแบบ ซึ่งความผิดปกตินั้นทำให้ได้สิ่งที่ผิดไปจากธรรมชาติ การที่ดีเอ็นเอที่ผิดปกติ คือ จะมีเบสใดเบสหนึ่งใน สายดี เอ็นเอถูก เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

**การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอ็ม (Ames Test)**

การศึกษาการกลายพันธุ์ได้ด้วยวิธี Plate Incorporation Test หรือ Ames Test ซึ่งเป็นการทดสอบ ที่พัฒนาขึ้นโดย Dr.Bruce Ames เพื่อใช้คัดกรองหาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของสารเคมี สารสกัดสมุนไพร ซึ่งเป็นการทดสอบการกลายพันธุ์แบบย้อนกลับ (Backward or Reverse Mutation) ในแบคทีเรีย Salmonella Typhimurium เพราะเนื่องจากแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ได้ถูกทำให้กลายพันธุ์ไปจนไม่สามารถ สังเคราะห์กรดอะมิโน Histidine ได้ จึงทำให้ไม่สามารถเจริญในตัวกลางที่ขาดกรดอะมิโนชนิดนี้ได้ เรียกว่า Histidine Dependent (His) โดยสารจะแพร่ผ่านอาหาร เลี้ยงเชื้อโดยตรง ซึ่งถ้าสารทดสอบมีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์จะทำให้แบคทีเรียชนิดนี้เกิดการกลายพันธุ์ ย้อนกลับ คือ สามารถสร้าง Histidine ได้เอง เป็น Histidine Independent (His+) ข้อดีของวิธีนี้คือ เป็นวิธีทดลองที่เหมาะสม มีประสิทธิภาพประหยัดเวลา สารเคมีและอุปกรณ์ในการวิจัย (ธิดารัตน์ แซ่ซื่อและวงศ์วิวัฒน์ ทัศนียกุล. 2556)

## สมุนไพรไทยที่ใช้ในงานวิจัย

**กระดังงาสงขลา**

**ชื่อวิทยาศาสตร์ :** *Cananga odorata (Lam.) Hook.F.&Thomson var.fruticosa (Craib)J.Sinclair*

**ชื่อวงศ์ :** Annonaceae (กลุ่มงานพฤกษาศาสตร์ป่าไม้, 2562)

**ลักษณะทั่วไป**

เป็นพืชไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1-3 เมตร เป็นใบเดี่ยว เรียงสลับสองด้านในระนาบเดียวกันของกิ่ง ใบรูปรี กว้าง 6-8 เซนติเมตร ยาว 10-14 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อเดี่ยว หรือเป็นกระจุก มีกลีบดอกสีเหลืองที่ปลายกิ่ง กลีบดอกยาวเรียวบิดเป็นเกลียวและอ่อนนิ่ม มีกลีบดอก 15-24 กลีบ เรียงตัวหลายชั้น ชั้นละ 3 กลีบ ดอกอ่อนสีเขียว เมื่อบานเปลี่ยนเป็นสีเหลือง กลิ่นหอมแรง ออกดอกตลอดปี

**การใช้ประโยชน์**

ปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีดอกสวยงามและมีกลิ่นหอม ในต่างประเทศนิยมนำดอกไปสกัดน้ำมันหอมระเหย (ปิยะ เฉลิมกลิ่น, 2546)

**สรรพคุณ**

ดอกเป็นสมุนไพร บำรุงหัวใจ นำดอกมาสกัดน้ำมันหอมระเหย แก้ลมวิงเวียน (จันทรกานต์ อธิกเจริญชัยกุล, 2550)

**กระดังงาลนไฟ**

นำกระดังงามาลนไฟก่อนนำไปใช้ โดยจะใช้ดอกสีเหลืองซึ่งเป็นลักษณะที่แก่จัด โดยใช้เปลวเทียนลนบริเวณกลีบดอก การลนจะค่อยๆ ลนกลีบจนทั่ว (ศรีสมร คงพันธ์และคณะ, 2531) ทั้งดอก แล้วบีบที่กระเปราะให้กลีบหล่นลงในน้ำ (จริยา เดชกุญชร, 2549) นิยมลนไฟก่อนนำไปใช้เพื่อให้เกิดความหอม ซึ่งการลนไฟนั้นทำให้ดอกกระดังงาช้ำ เมื่อดอกกระดังงาช้ำ จะมีกลิ่นหอม (วรนิธิ สมุทรวนิช, 2539)

**การศึกษาทางเภสัชวิทยา**

น้ำมันหอมระเหยจากดอกกระดังงาสงขลา สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเชื้อ Escherichia Coli (กาญจนา ภิณโญภาพ, 2551)

## งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กาญจนา ภิญโญภาพและคณะ (2552) ได้ทำการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชวงศ์กระดังงาบางชนิด ได้แก่ ดอกสายหยุด ใบสายหยุด ดอกการเวก ใบการเวก ดอกกระดังงาไทยและใบกระดังงาไทย นำมาวัดปริมาณ Total Phenolic Compound โดยวิธี Folin-Ciocalteu' method เทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid ผลการวัดปริมาณ Total Phenolic Compound นั้นพบว่า ดอกกระดังงาไทย (860.574±2.21 mg/ml) มีปริมาณ Total Phenolic Compound มากสุด รองลงมา คือ ใบสายหยุด (540.54±1.67 mg/ml) ดอกสายหยุด (417.716±11.15 mg/ml) ใบการเวก (256.94±1.004 mg/ml) ใบกระดังงา (213.613±0.9 mg/ml) และดอกการเวก (116.876±4.54 mg/ml ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการวัดความสามารถในการกำจัดกัด 2, 2-diphenyl-1-picryl hydrazyl radical (DPPH) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 2, 6-di-tert-butyl-4-methylphenol (Butylated Hydroxyl Toluene; BHT) พบว่า สารสกัดจากใบกระดังงาไทย ($IC_{50}$ = 0.00925 mg/ml) แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือใบการเวก ($IC_{50}$ = 0.0195 mg/ml) ดอกกระดังงาไทย ($IC_{50}$ = 0.0365 mg/ml) ใบสายหยุด ($IC_{50}$ = 0.0525 mg/ml) และดอกการเวก ($IC_{50}$ = 0.073 mg/ml) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพสูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ BHT ฉะนั้นอาจนำไปใช้แทนสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ในเครื่องสำอางและอุตสาหกรรมอาหารได้ จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพพืชทั้ง 3 ชนิด พบว่าออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Escherichia coli* ได้ชนิดเดียว และไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus Epidermidis, Xanthomonas Campestris* Pathovar.*citri*

ชาญฤทธิ์ สัพพัญญูและคณะ (2553) ได้ทำการศึกษาการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากพืชวงศ์กระดังงาสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ ดอกนมแมว ใบนมแมว ใบน้อยหน่า ใบกระดังงาไทย ดอกกระดังงาไทย ใบลาดวน ผลกระดังงาจีน ดอกกระดังงาจีน ใบทุเรียนเทศใบ และใบการเวก นำมาวัดปริมาณ Total Phenolic Compound โดยวิธี Folin-Ciocalteu' Method เทียบกับสารมาตรฐาน Gallic Acid ผลการวัดปริมาณ Total Phenolic Compound นั้น พบว่า ดอกนมแมว (0.697±0.036 mg/mg) มีปริมาณ Total Phenolic Compound มากสุด รองลงมา คือ ใบนมแมว (0.648±0.025 mg/mg) ผลกระดังงาจีน (0.407±0.025 mg/mg) ใบน้อยหน่า (0.394±0.306 mg/mg) ใบทุเรียนเทศ (0.318±0.087 mg/mg) ใบกระดังงาไทย (0.277±0.126 mg/mg) ใบกระดงงาจีน (0.168±0.077 mg/1mg) ใบลำดวน (0.168±0.084 mg/1mg) ดอกกระดังงาไทย (0.164±0.063 mg/1mg) และใบการเวก (0.152±0.112 mg/mg) ตามลำดับ และทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการวัดความสามารถในการกำจัดกัด 2, 2-diphenyl-1-picryl hydrazyl radical (DPPH) ที่เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 2, 6-di-tert-butyl-4-methylphenol (Butylated Hydroxyl Toluene; BHT) พบว่า สารสกัดจากใบกระดังงาไทย ($IC_{50}$ = 54.58±0.240 μg/ml) ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ซึ่งมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ BHT ($IC_{50}$ = 69.97±1.4 μg/ml) และวิตามินอี

สังเคราะห์ ($IC_{50}$= 5712.53±2461.682 μg/ml) ส่วนสารสกัดของพืชวงศ์กระดังงาสายพันธุ์ต่างๆ ที่เหลือ มีค่า $IC_{50}$ มากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสงเคราะห์ BHT แต่ต่ำกว่าวิตามินอีสังเคราะห์ เพราะฉะนั้นอาจนำสารสกัดจากพืชใบกระดังงาไทย ใช้แทนสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ BHT และวิตามินอีสังเคราะห์ในเครื่องสำอาง ในอุตสาหกรรมอาหารและยาได้

นุตติยา วีระวัธนชัยและระวิวรรณ แก้วอมตะวงศ์ (2554) ได้การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ลดการสร้างเม็ดสีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากกระดังงาจีน โดยการนำใบของสมุนไพรกระดังงาจีน *A.hexapetalus* มาทำแยกสาร จากนั้นทำการศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคเสปคโทรเมตรี ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส แยกสารได้กลุ่มจำพวก Flavonoid ได้แก่ quercetin 3 – *O* – α - L- rhamnosyl- (1⟶2) – α - L-arabinofuranoside, apigenin 7-*O*-β-L-D-glucopyranoside และ quercetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1⟶6)-β-D-glucopyranoside พบว่าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุดคือ apigenin 7-*O*-β-L-D-glucopyranoside ที่ $IC_{50}$ 25.15 μM แล้วทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรกระดังงาจีน พบว่าสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลได้ที่สุดคือ quercetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl -(1⟶6)-β-D-glucopyranoside ที่ $IC_{50}$ 11.25 μM รองลงมา คือ quercetin 3-*O*-α-L-rhamnosyl-(1⟶2)-α-L-arabinofuranoside, apigenin 7-*O*-β-L-D-glucopyranoside ที่ $IC_{50}$ 13.39 μM

วาทินี เสล่ราษฎร์และจงกลนี จงอร่ามเรือง (2559) ได้ศึกษาการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของทุเรียนเทศ (*Annona Muricata*) ด้วยวิธีการแช่หมักต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทิลอะซิเตด เมทานอลและไดคลอโรมีเทนในส่วนใบและเปลือกของสมุนไพรทุเรียนเทศ ได้สารสกัดหยาบ 6 ตัวอย่าง แล้วทำการศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นด้วยปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีและการตกตะกอน ซึ่งพบว่ามีสารจำพวก ฟีนอลิก อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แทนนินและคูมารินและได้ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยเทคนิคโครมาโทรกราฟฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography; TLC) แล้วพบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดส่วนใบและเปลือกของสมุนไพรทุเรียนเทศทั้ง 6 ตัวอย่าง จากนั้นศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Disc Diffusion และใช้ตัวแทนแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 2 ชนิด คือ *Staphylococus Aureus* กับ *Bacillus Subtilis* และตัวแทนแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 2 ชนิด *Escherichia Coli* กับ *Pseudomonas Aeruginosa* พบว่าสารสกัดเมทานอลจากเปลือกของสมุนไพรทุเรียนเทศสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacillus Subtilis* ได้บ้าง โดยให้ค่า Inhibition Zone 6.66±0.20 มิลลิเมตร ซึ่งได้ให้ค่าค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ Chloramphenical

U. Muchjajib & S. Muchjajib (2554) The study was aimed at finding the optimal harvesting time for ylang-ylang flowers to maximize the essential oil yield. It was conducted at the Plant Science Department, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi, Huntra

Ayutthaya, Thailand from June 2008 to January 2010.There were 4 experiments: different times of picking and distilling; the different stages and sizes of the flowers. The results have shown that picking flowers at 8:00 am, 12:00 noon and 4:00 pm gave 0.42, 0.40 and 0.35% v/w respectively, while picking flowers at 8:00 am and the hydro- distilling process done at 9:00 am, 1:00 pm and 5:00 pm gave 0.45, 0.44, and 0.44% v/w. Yet when the distilling time was done at 9:00 am the following day, it resulted in a higher amount of essential oil with 0.67% v/w. It was obvious to see that the stages and sizes of flowers affected the essential oil yield. The percentage of essential oil yield from the immature green stage, the mature greenish-yellow stage and the ripe yellow stage were 0.25, 0.41 and 0.31% v/w. The large flowers (1.37×7.14 cm; 1.91 g/flower) gave the greatest amount of essential oil with 0.77% v/w whereas the medium flowers (1.20×5.87 cm; 1.56 g/flower) gave 0.47% v/w. The small flowers (1.18×5.08 cm, 1.10 g/flower) gave only 0.16% v/w. The main constituents of the ylang-ylang essential oil extracted from hydro-distillation method analysed by Gas chromatography/Mass spectrometry were as follows: geranyl acetate (18.28%), benzyl benzoate (14.42%), germacreneD (10.92%), trans-caryophyllene (10.71%), geraniol (8.44%) and eugenol (6.65%).

Phan Minh Giang & Phan Tong Son (2559). Cananga odorata (Lam.) Hook. f. et Th. var. fruticosa (Craib) J. Sincl. is a less well-known ylang-ylang species. The flower essential oil of the plant growing in northern Vietnam was analyzed for the first time in this study using GC and GC-MS analysis. The identification of the main constituents $\alpha$-humulene (7.1%), germacrene D (8.1%), (E, E)-$\alpha$-farnesene (12.6%), (E, E)-farnesol (5.6%) and benzyl benzoate (3.8%) agrees well with the results previously reported for ylang-ylang (C. odorata) oils. The major aroma constituents of the oil were identified as linalool (8.7%) and $\beta$-caryophyllene (26.8%).

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้มุ่งตรวจสอบหาน้ำมันหอมระเหยจากกระดังงาไทยและกระดังงาสงขลาก่อนลนไฟและหลังลนไฟ ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทสโกปีและทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ โดยผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย
2. สารเคมี
3. ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย
4. แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบการก่อกลายพันธุ์
5. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง
6. วิธีการทดลอง

## เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องฉาย UV Detector for TLC (UV-Cabinet II, รุ่น CM 10)
2. เครื่องทำความเย็น (Clooding รุ่น Scientific Instruments)
3. ตัวให้ความร้อน (Heating Mantle รุ่น Electromantle)
4. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง (รุ่น Mettler Toledo)
5. ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย
6. ขวดแก้วสีชาหรือ Amber Glass Bottle
7. แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC Plate)
8. หลอดแคปิลลารี่ (Capillary)
9. บีกเกอร์ (Beaker)
10. ขวดกลั่น (Flask Distillation : ขนาด 1,000 ml.)
11. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask : ขนาด 10 ml. และ 100 ml.)
12. อะลูมิเนียมฟลอยด์ (Aluminium Foil)
13. สำลี (Cotton)
14. ปิเปต (Pipette : ขนาด 0.1 ml)

15. ที่คีบ (Forceps)

16. เทียน (ตะเกียง)

17. ไฟแช็ต

18. มีด

19. เขียง

**สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย**

1. เมทานอล (Methanol) , A.R. Grade
2. ไดคลอโรมีเทน (Dichoromethane) , A.R. Grade
3. เฮกเซน (Hexane) , A.R. Grade
4. เอทิลแอซีเตต (Ethyl acetate) , A.R. Grade
5. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

## ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย

พืชสมุนไพรไทยที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เก็บจากจังหวัดนครปฐม โดยทำการเก็บในสภาวะสด รวมทั้งหมดด้วยกันมี 2 ชนิด ดังตารางที่ 2

**ตารางที่ 2 รายชื่อสมุนไพรไทยที่นำมาทำการทดลอง**

| ลำดับ | ชื่อสมุนไพร | ชื่อวิทยาศาสตร์ | ส่วนที่ใช้ | แหล่งที่มา |
|---|---|---|---|---|
| 1 | กระดังงาไทย | *Cannaga odorata* (Lamk) Hook. f. et Th. | ดอก | นครปฐม |
| 2 | กระดังงาสงขลา | *Cannaga odorata* Hook. f. et Th.var. fruticosa (Craib) J. Sincl. | ดอก | นครปฐม |

## แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบการก่อกลายพันธุ์

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบการก่อกลายพันธุ์ คือ *S. typhimurium* TA100 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Prof. T. Matsushima แห่ง Japan Bioassay Research Center ในประเทศญี่ปุ่น

## สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. เตรียมสารละลาย 2, 2 – Diphenyl – 1 – picrylhydrazyl (DPPH) ที่ความเข้มข้น 1000 ppm ที่ใช้ในการทดสอบโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยชั่ง 2, 2 – Diphenyl – 1 – picrylhydrazyl (DPPH) มา 100 มิลลิกรัม (0.1 กรัม) นำไปละลายในเมทานอลให้ได้ 100 มิลลิลิตร

จากนั้นทำการเก็บสารละลาย DPPH ไว้ในขวดสีชาที่ห่อหุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟลอยด์แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. เตรียมสารละลาย 2, 2 – Diphenyl – 1 – picrylhydrazyl (DPPH) ที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่ใช้ในการทดสอบเชิงปริมาณวิเคราะห์ โดยชั่ง 2, 2 – Diphenyl – 1 – picrylhydrazyl (DPPH) หนัก 0.0394 กรัม นำไปละลายในเมทานอลให้ได้จำนวน 500 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเก็บสารละลาย DPPH ไว้ในขวดสีชาที่ห่อหุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟลอยด์แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## วิธีการทดลอง

**การเตรียมกระดังงาสงขลาลนไฟ**

นำดอกกระดังงาสงขลา มาลนไฟด้วยเทียนไข โดยให้เปลวเทียน โดนกลีบดอก วิธีการลนจะค่อยๆ ลน จนทั่วทีละดอก จนกระทั่งกลีบดอกกระดังงาช้ำหรือสังเกตได้จากสีที่เปลี่ยนไปของกลีบดอกเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล จะได้สมุนไพรเป็น 2 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วย ดอกกระดังสงขลา และดอกกระดังงาสงขลาลนไฟ

**การศึกษาการกลั่นน้ำมันหอมระเหย**

นำตัวอย่างดอกกระดังงาทั้ง 4 ตัวอย่าง มาทำการหั่น จากนั้นนำตัวอย่าง ไปใส่ในขวดก้นกลม (Round Bottomed Flask) แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ท่วมประมาณ 3 ใน 4 ของภาชนะกลั่น หลังจากนั้นทำการต่อเข้ากับเครื่องควบแน่นและเครื่องรับ แล้วทำการกลั่นเป็นเวลา **4** ชั่วโมง เมื่อกลั่นเสร็จแล้วทำการเก็บชั้นของน้ำมันหอมระเหยที่อยู่ชั้นบนสุดและคำนวณหาร้อยละของสารที่สกัดได้ต่อน้ำหนักของพืชสมุนไพร (% yield)

**การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบเคมีโดยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin layer chromatography; TLC) และทำการตรวจสอบด้วย DPPH ของน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้**

1. การเตรียมแผ่นโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) โดยใช้ดินสอขีดเส้นให้ห่างจากขอบด้านหนึ่งประมาณ 1 เซนติเมตร เป็นแนวจุดเริ่มต้นของสาร และเส้นนี้ต้องอยู่เหนือระดับตัวทำละลาย จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยทั้ง 4 ตัวอย่างมาทำการจุด (Spot) บนแผ่น TLC

2. การเตรียมระบบตัวทำละลาย TLC เตรียมสารละลายผสมที่ประกอบด้วย ไดคลอโรมีเทน: เฮกเซน (9:1) นำหลอดคะปิลลารีมาจุ่มสารตัวอย่างแล้วนำมาจุดบน TLC ตรงตำแหน่งบนเส้นดินสอ ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วจุดสารซ้ำ หลายครั้งกระทั่งได้สารเข้มข้น แล้วใช้ดินสอกำหนดตำแหน่งสิ้นสุดของระดับตัวทำละลายที่ขอบด้านบน แล้วนำ แผ่น TLC ที่ทำการจุดสารเรียบร้อยแล้วนำไปจุ่มในแท่งที่บรรจุตัวทำละลาย แล้วปิดฝา ปล่อยให้ตัวทำละลายซึมผ่านแผ่น TLC จนตัว

ทำละลายถึงตำแหน่งสิ้นสุด จากนั้นนำ แผ่น TLC ออกมาผึ่งให้แห้ง ให้สังเกตและทำการบันทึกโครมาโทแกรม

3. ทำการนำแผ่นโครมาโทรแกรมเพื่อตรวจสอบการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ด้วยเครื่องส่องรังสีเหนือม่วง (UV-Light) ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร บันทึกภาพโครมาโทรแกรมภายใต้แสง UV

4. ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการพ่นสารละลาย 2, 2 – Diphenyl – 1 – picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งมีสีม่วงเข้มลงบนแผ่น TLC ให้ทั่วแล้วทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วสังเกตตำแหน่งที่ปรากฏการฟอกจางสีบนพื้นสีม่วง แสดงว่าสารในตำแหน่งนั้นมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

**การทดสอบเชิงปริมาณวิเคราะห์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Assay ของน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นด้วยน้ำ**

เตรียมสารละลาย Methanolic DPPH radical เข้มข้น 0.2 mM เตรียมน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดความเข้มข้น ในช่วง 10-6000 ppm ละลายใน methanol นำน้ำมันหอมระเหยแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 ml ผสมกับสารละลาย DPPH 9 ml ในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณ % Radical Scavenging จากสมการ

$$\% \text{ radical scavenging} = 1-( A_{sample}/ A_{control}) \times 100$$

เมื่อ $A_{sample}$ = ค่า absorbance ที่วัดได้ของสารละลายที่ผสมกับ DPPH แล้ว

$A_{control}$ = ค่า absorbance ที่วัดได้ของ DPPH และตัวทำละลายที่ใช้

เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน วิตามินซี โดยพล็อตกราฟ ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรกับ % radical scavenging จากนั้นหาค่า $IC_{50}$ หรือความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้ง DPPH ได้ครึ่งหนึ่ง (ภาคผนวก)

**การวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีสเปกโทรมิเตอร์มวล**

1. ศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากกระดังงาสงขลาก่อนลนไฟและหลังลนไฟ

2. ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี- สเปกโทรมิเตอร์มวล โดยมีสภาวะของ GC-MS 5890 series II ; MSD 5971A, Hewlett Packard, Vienna, Austria)

| | | |
|---|---|---|
| สภาวะของ GC-MS | : | |
| คอลัมน์ | : | 30 เมตร |
| เส้นผ่าศูนย์กลาง | : | 0.25 มิลลิเมตร |
| ความหนาของฟิล์ม | : | 0.25 ไมโครเมตร |

| | | |
|---|---|---|
| อุณหภูมิช่องสารตัวอย่าง | : | 250 องศาเซลเซียส |
| ปริมาณตัวอย่างฉีด | : | 1 ไมโครลิตร |
| ฉีดตัวอย่างแบบ Spilt Ratio | : | 5:1 |
| อุณหภูมิเริ่มต้น | : | ที่ 45 องศาเซลเซียส |
| อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ | : | 5 °C / min จนถึง 230 องศาเซลเซียส คงไว้ 5 นาที รวมเวลา 45 นาที |
| แก๊สพา | : | ฮีเลี่ยม (He) |
| อัตราการไหลของแก๊ส | : | 1 ml/min |
| ตรวจวัดที่ | : | 25-350 amu |

หลังจากการแยกเสร็จสมบูรณ์ รวบรวมโครมาโทแกรมและสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหย โดยนำมาเปรียบเทียบ Mass Spectrum ของสารแต่ละชนิดที่แยกได้ในน้ำมันหอมระเหยกับ Mass Spectra ของสารมาตรฐานต่างๆ ใน Library ของเครื่อง GC-MS โดยพิจารณาเลือกสารมาตรฐานใน Library ให้ % Matching กับพีก (Peak) ของน้ำมันหอมระเหยมากกว่า 85 %

**การตรวจสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธ์โดยวิธีเอมส์ (Ames Test)**

1. การเตรียมเชื้อสำหรับทดสอบ

นำเชื้อ *Sallmonella Typhimurium* TA100 มาเลี้ยงในอาหาร Oxoid Nutrient Broth (12 Ml) จากนั้นทำการบ่ม ในเครื่องเขย่า พร้อมทั้งระบบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วที่ 100 rpm เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางลง 8 เท่า ด้วย Sodium Chloride (NaCl) ในความเข้มข้นที่ร้อยละ 0.9 เพื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวของคลื่นเท่ากับ 620 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ในระหว่างช่วง 0.3-0.4

2. การเตรียม Nitrosated Products โดยทำการเตรียมหลอดทดลองสำหรับ TA100 ด้วยการเติม 0.2 M HCI 710 µl $NaN_3$ 40 µl และ 2 M ammonium Sulfamate 250 ไมโครลิตร ลงไปในหลอด จากน้ำนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที

3. การทดสอบฤทธิ์การก่อกลายพันธ์ของสารสกัดสมุนไพร

3.1 ทำการเตรียมน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 12.5 µl, 25 µl และ50 µl แล้วปรับปริมาตร ให้ครบ 1000 µl

3.2 นำหลอดทดลองทั้ง 3 หลอด โดยการเติม Nitrosated Products 100 µl และ $Na_3PO_4$KCI buffer 500 µl จากนั้นทำการเติมน้ำมันหอมระเหยในแต่ละความเข้มข้น 100 µl เติมเชื้อ *Sallmonella Typhimurium* TA100 เติม 100µl นำไป Incubate บน Shaking Water Bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที หลังจากนั้นเติม Top Ager 2 ml

3.3 แล้วนำไปเทบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร นำจานเลี้ยงเชื้อไป Incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง จากนั้นให้นับจำนวนโคโลนีที่เจริญเติบโตขึ้นแล้วนำจำนวนโคโลนีที่นับได้มาทำการคำนวณหาดัชนีการกลายพันธุ์ (Mutagenicity Index; MI) เพื่อดูจำนวนโคโลนีการ กลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นโดยคำนวณจากจำนวนโคโลนีเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบสารสกัดหลังทดลองแล้วทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง หารด้วยจำนวนโคโลนีเฉลี่ยที่ได้จาก Negative Control (ใช้น้ำปราศจากเชื้อ) ถ้าจำนวนค่าของ MI มีค่ามากกว่า 2 ขึ้นไป แสดงว่าสารที่ทำการทดสอบเรียบร้อยแล้วนั้นมีฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์

# บทที่ 4
# ผลการทดลองและอภิปรายผลงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากดอกกระดังงาสงขลาก่อนลนไฟและหลังลนไฟและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีและแมสสเปกโทสโกปี

สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย มีทั้งหมด 2 ตัวอย่าง คือ กระดังงาสงขลา กระดังงาสงขลาลนไฟ โดยแสดงผลการทดลองดังนี้

## ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยของสมุนไพรไทย 2 ตัวอย่าง

จากผลการศึกษาปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้โดยใช้วิธีการกลั่นด้วยน้ำจากสมุนไพร 2 ตัวอย่าง ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหย และสีของน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้ คือ เหลืองใส ดังแสดงในตารางที่ 3

**ตารางที่ 3 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากสมุนไพรไทย 2 ตัวอย่าง**

| ลำดับ | สมุนไพร | ลักษณะสี | J]<br>\% yield |
|---|---|---|---|
| 1 | กระดังงาสงขลา | ของเหลวสีเหลืองใส | 0.169 |
| 2 | กระดังงาสงขลาลนไฟ | ของเหลวสีเหลืองใส | 0.515 |

จากผลการศึกษาปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้โดยใช้วิธีการกลั่นด้วยน้ำจากสมุนไพร 2 ตัวอย่าง พบว่า น้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาที่ผ่านการลนไฟมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากกว่า น้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาที่ยังไม่ผ่านการลนไฟ

## ผลทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของน้ำมันหอมระเหยของสมุนไพรไทย 2 ตัวอย่าง

เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้ทั้ง 2 ตัวอย่าง คือ กระดังงาสงขลาและกระดังงาสงขลาลนไฟ มาศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบเคมีที่แยกโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีและทำการตรวจสอบด้วย DPPH จากนั้นทำการบันทึกผล ที่ได้จากการตรวจสอบด้วยคลื่นแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร และทำการตรวจสอบด้วย DPPH และ $R_f$ ของแต่

ละส่วนที่แยกได้ โดยการสังเกตความเข้มของสีเหลืองที่ปรากฏบนทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยกำหนดให้ความเข้มของสีเหลืองที่มากที่สุด มีค่าเท่ากับ ++++ ความเข้มของสีเหลืองที่มากมีค่าเท่ากับ +++ ความเข้มของสีเหลืองน้อยมีค่าเท่ากับ ++ ความเข้มของสีเหลืองที่น้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ + และไม่ปรากฏสีเหลืองมีค่าเท่ากับ – โดยที่ผลของการทดลองจะแสดงเฉพาะ fraction ที่ให้ผลของการทดสอบกับ DPPH แล้วสามารถแสดงสีเหลืองเท่านั้น ดังตารางที่ 4 และภาพที่ 2

**ตารางที่ 4 แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระจากน้ำมันหอมระเหยของสมุนไพรไทย 2 ตัวอย่าง**

| Essential oil | UV absorbance (254 nm) | | UV (365 nm) | DPPH reagent |
|---|---|---|---|---|
| | Fraction number | ค่า $R_f$ | | |
| กระดังงาสงขลา | 1 | 0.2823 | สีน้ำเงิน | - |
| | 2 | 0.3058 | สีฟ้า | - |
| | 3 | 0.5411 | สีน้ำเงิน | + |
| | 4 | 0.6000 | สีฟ้า | - |
| | 5 | 0.7529 | สีน้ำเงิน | ++ |
| กระดังงาสงขลา ลนไฟ | 1 | 0.3411 | สีน้ำเงิน | - |
| | 2 | 0.4204 | สีฟ้า | - |
| | 3 | 0.4352 | สีน้ำเงิน | ++ |
| | 4 | 0.5411 | สีฟ้า | - |
| | 5 | 0.7176 | สีน้ำเงิน | - |

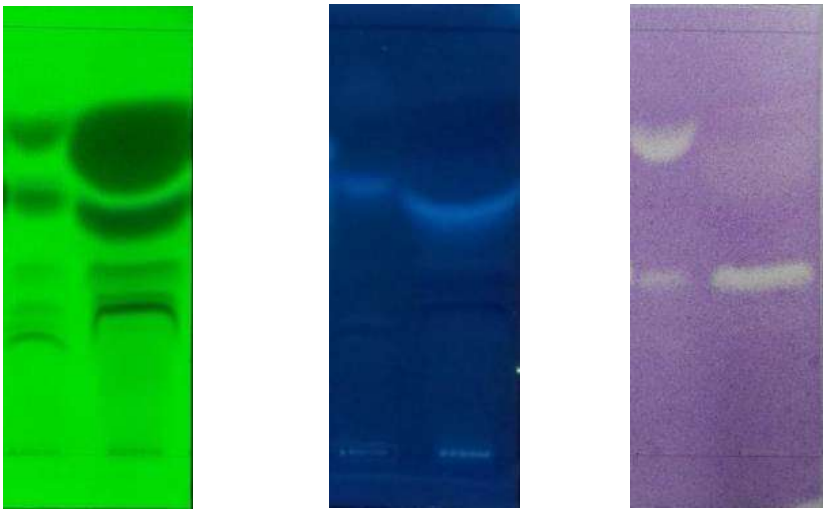
**น้ำมันหอมระเหยจาก กระดังงาสงขลา**

จากผลการทดลอง พบว่า Faction ที่ 3 และ 5 ของน้ำมันหอมระเหยจากกระดังงาสงขลาแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการสังเกตด้วยตาเปล่าบนแผ่น TLC มีค่าเท่ากับ 1+ และ 2+ ตามลำดับ Faction ที่ 3, 5 เรืองแสงในความยาวคลื่น UV- 365 nm ให้แสงสีน้ำเงิน และ ปรากฏแถบทึบแสงในความยาวคลื่น UV- 254 nm

**น้ำมันหอมระเหยจาก กระดังงาสงขลาลนไฟ**

จากผลการทดลอง พบว่า Faction ที่ 3 ของน้ำมันหอมระเหยจากกระดังงาสงขลาลนไฟแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการสังเกตด้วยตาเปล่าบนแผ่น TLC มีค่าเท่ากับ 2+ เรืองแสงในความยาวคลื่น UV-365 nm ให้แสงสีน้ำเงิน และ ปรากฏแถบทึบแสงในความยาวคลื่น UV- 254 nm

ภาพที่ 1 ภาพที่ 2 ภาพที่ 3



**ภาพที่ 2 ดังในภาพที่ 1, 2 และ 3 แสดง Pattern ของ Chromatogram ของ Essential Oil ของ (1) กระดังงาสงขลาก่อนลนไฟ (2) กระดังงาสงขลาหลังลนไฟ ตรวจสอบด้วย UV ความยาวคลื่น 254 nm, 365 nm และ DPPH reagent ตามลำดับ**

**หมายเหตุ** Solvent System ที่ใช้ คือ 1% ethyl acetate ใน Hexane

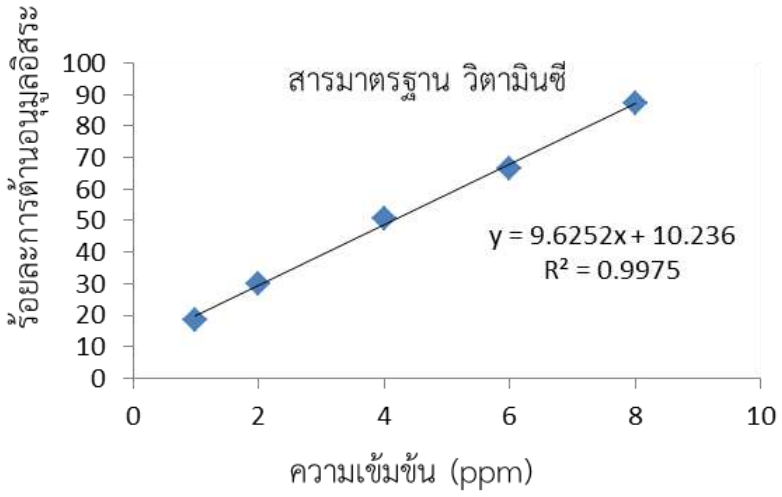
## ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย โดยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)

จากการนำน้ำมันหอมระเหยทั้ง 2 ตัวอย่าง ที่ทำการสกัดโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay) โดยนำสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก และน้ำมันหอมระเหย ทั้ง 2 ตัวอย่าง มาวัดค่าการดูดกลืนแสงของที่ความยาวคลื่น 517 nm ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ที่ช่วงความเข้มข้น 400-10000 ppm และจากนั้นนำมาคำนวณหาค่า % radical scavenging ซึ่งแสดงผลการทดลองดังตารางที่ 5-6 และภาพที่ 3

**ตารางที่ 5 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก**

| Concentation (ppm) | Average | % radical scavenging |
|---|---|---|
| 1 | 0.132 | 93.24 ± 0.001 |
| 2 | 0.249 | 87.2 ± 0.008 |
| 4 | 0.649 | 66.72 ±0.007 |
| 6 | 0.960 | 50.76 ± 0.003 |
| 8 | 1.364 | 30.02 ± 0.015 |
| 10 | 1.586 | 18.61 ± 0.001 |
| DPPH | 1.821 | 0 |

จากตารางที่ 5 นำค่า % radical scavenging และค่าความเข้มข้นของวิตามินซี มาสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้สำหรับการหาค่า $IC_{50}$ ของสารมาตรฐานวิตามินซี แสดงดังภาพที่ 3 พบว่า วิตามินซีมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 4.133 ppm

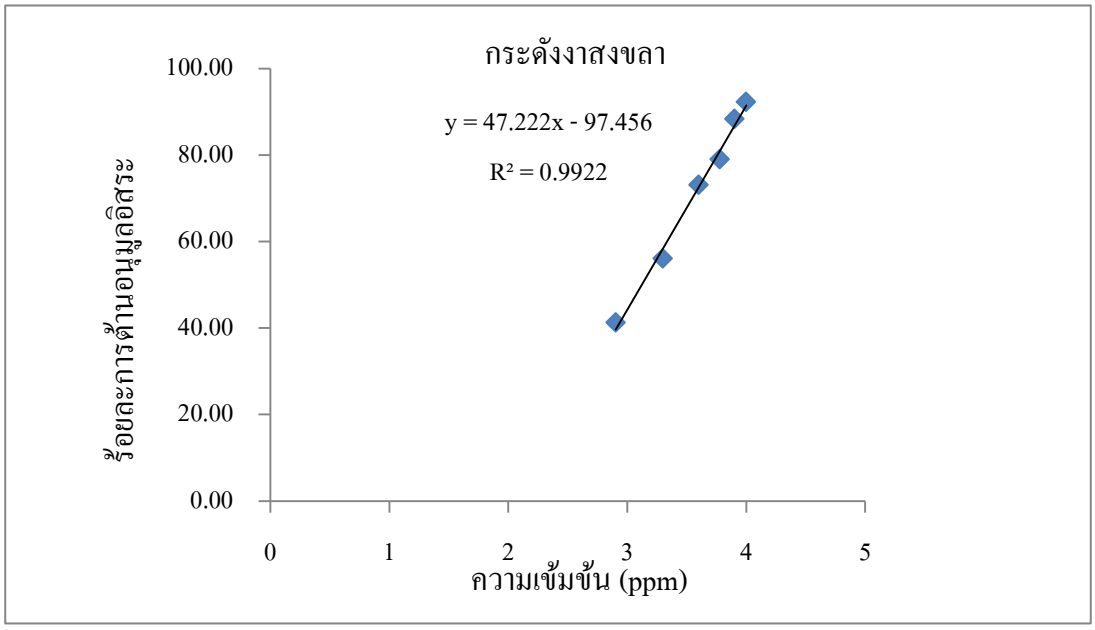



**ภาพที่ 3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซี**

**ตารางที่ 6 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรที่สกัดด้วยน้ำ**

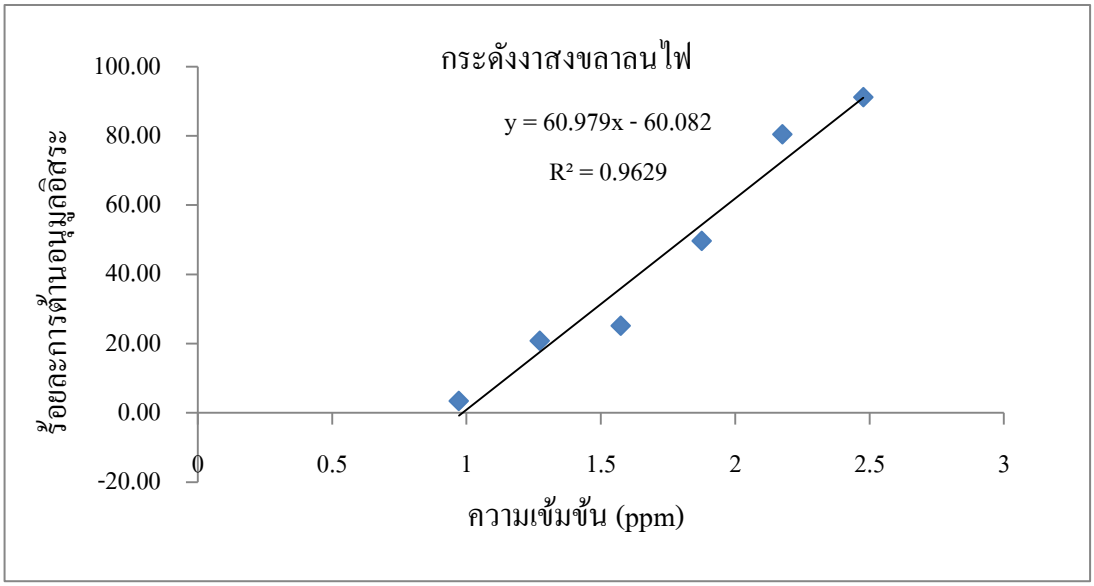
| Sample | Concentation (ppm) | average | % radical scavenging |
|---|---|---|---|
| กระดังงาสงขลา | 10,000 | 0.182 | 92.21±0.003 |
| | 8,000 | 0.272 | 88.34±0.006 |
| | 6,000 | 0.490 | 79.01±0.022 |
| | 4,000 | 0.629 | 73.08±0.010 |
| | 2,000 | 0.693 | 56.06±0.003 |
| | 800 | 1.372 | 41.24±0.016 |
| | 600 | 1.443 | 38.20±0.002 |
| | 400 | 1.665 | 28.71±0.032 |
| DPPH | Control | 2.335 | 0 |
| กระดังงาสงขลาลนไฟ | 30,000 | 0.171 | 91.15±0.015 |
| | 15,000 | 0.248 | 80.45±0.029 |
| | 10,000 | 1.119 | 54.66±0.030 |
| | 8,000 | 1.182 | 52.11±0.084 |
| | 6,000 | 1.397 | 43.41±0.007 |
| | 4,000 | 1.640 | 33.54±0.047 |
| | 2,000 | 1.925 | 22.00±0.023 |
| | 800 | 2.178 | 11.74±0.025 |
| | 600 | 2.220 | 9.15±0.020 |
| | 400 | 2.240 | 9.24±0.015 |
| DPPH | Control | 2.335 | 0 |

จากผลการทดสอบเชิงปริมาณวิเคราะห์ ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ นำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้จากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ดังภาพที่ 4-5




**ภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลา**

จากผลการทดลอง Spectrophotometric Assay ของน้ำมันหอมระเหยจากกระดังงาสงขลา ดังตารางที่ 6 พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกระดังงาสงขลา ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm จะมีร้อยละการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเท่ากับ 92.2 และที่ความเข้มข้น 400 ppm จะมีร้อยละการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุดเท่ากับ 28.7 ดังแสดงในภาพที่ 4




**ภาพที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาลนไฟ**

จากผลการทดลอง Spectrophotometric Assay พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกระดังงาสงขลาลนไฟ ดังตารางที่ 6 พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกระดังงาสงขลาลนไฟ ที่ความเข้มข้น 30,000 ppm จะมีร้อยละการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเท่ากับ 91.15 และที่ความเข้มข้น 937.5 ppm จะมีร้อยละการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุดเท่ากับ 3.38 ดังแสดงในภาพที่ 5

จากกราฟแสดงร้อยละการต้านอนุมูลกับความเข้มข้นต่างๆ กัน ของน้ำมันหอมระเหย ทั้ง 2 ตัวอย่าง เมื่อนำมาหาค่าความสามารถในการลดอนุมูลอิสระได้ที่ร้อยละ 50 ($IC_{50}$) แสดงผลดังตารางที่ 7

**ตารางที่ 7 ผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระที่สามารถลดอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง ($IC_{50}$) ของสารสกัดสมุนไพร ทั้ง 2 ตัวอย่าง ที่สกัดด้วยน้ำ**

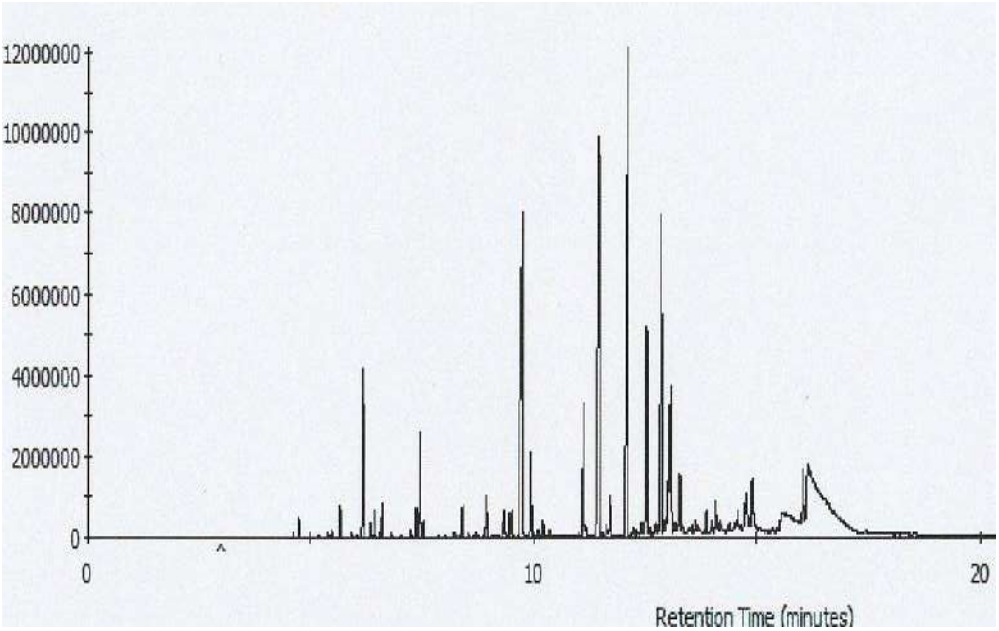
| ตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย | $IC_{50}$ (ppm) |
|---|---|
| กระดังงาสงขลา | 1,239±48.81 |
| กระดังงาสงขลาลนไฟ | 7,937.772±375.343 |
| วิตามินซี | 4.133.000 |

จากตารางที่ 7 จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการหาค่าความเข้มข้นในน้ำมันหอมระเหย ทั้ง 2 ตัวอย่าง น้ำมันหอมระเหยจากดอกกระดังงาสงขลา ($IC_{50}$ = 1,239±48.81 ppm) และรองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากดอกกระดังงาสงขลาลนไฟ ($IC_{50}$ = 7,937.772±75.343 ppm) ตามลำดับ และเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยทั้ง 2 ตัวอย่าง นำมาเทียบกับสารมาตรฐาน วิตามินซี แล้วพบว่าน้ำมันหอมระเหยทั้ง 4 ตัวอย่าง มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 ได้น้อยกว่าสารมาตรฐาน วิตามินซี ( $IC_{50}$ = 4.133 ppm)

## ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรมิเตอร์ (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)

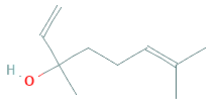
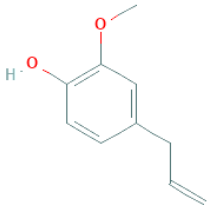
ผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจากดอกกระดังงาสงขลาก่อนลนไฟและหลังลนไฟ โดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรสโกปี (GC-MS 5890 series II; MSD 5971A, Hewlett Packard, Vienna, Austria) คอลัมน์ GC Column HP-5MS ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 ไมโครเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร ใช้ Helium (He) เป็น Carrier Gas ด้วยอัตรา 2 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณตัวอย่างที่ฉีด 1 ไมโครลิตร ฉีดตัวอย่างเป็นแบบ Spilt ratio 2:5 และใช้โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิโดย ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 27 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 100 องศาเซลเซียส คงไว้ 6.29

นาที รวมเวลา 35 นาที หลังการแยกเสร็จสมบูรณ์ ให้เทียบ Mass Spectrum ของสาร แต่ละชนิดที่แยกได้กับ Mass Spectrum ของสารมาตรฐานใน Libery ของเครื่อง โดยอ่านค่า % massing ที่ 85% ขึ้นไป แสดงผลดังตารางที่ 8-11 และภาพที่ 6-7

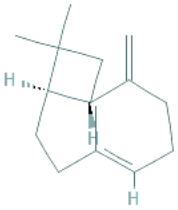
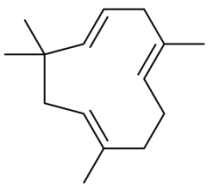
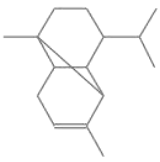



**ภาพที่ 6 โครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลา**

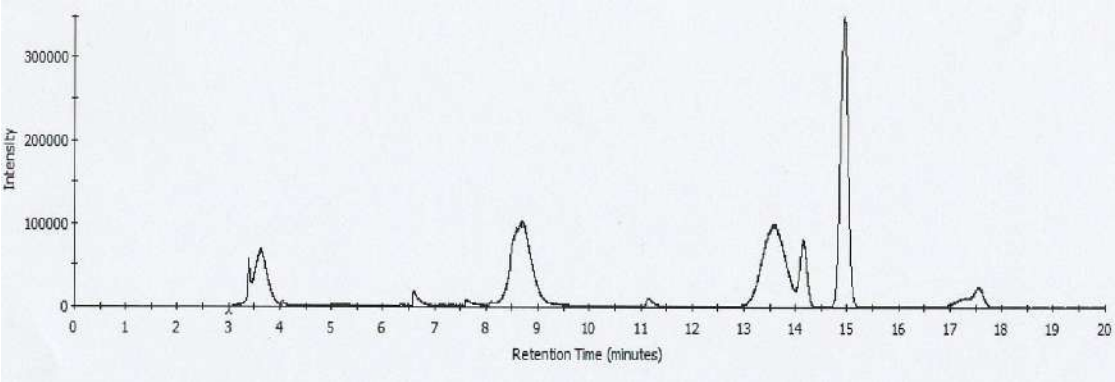
**ตารางที่ 8 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของกระดังงาสงขลา**

| SI. No | Compound | Peak areas ( % ) | Retention Time (RT) | Structure |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Linalool | 2.34 | 7.45 |  |
| 2 | Eugenal | 3.09 | 11.10 |  |

**ตารางที่ 8 (ต่อ)**

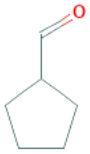
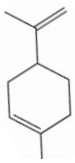
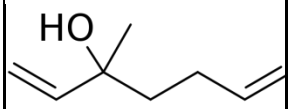
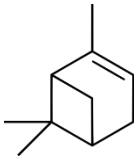
| SI. No | Compound | Peak areas ( % ) | Retention Time (RT) | Structure |
|---|---|---|---|---|
| 3 | β – Caryophylene | 14.10 | 12.09 |  |
| 4 | Humulene | 5.32 | 12.52 |  |
| 5 | α-Copaene | 9.0 | 12.85 |  |

จากตารางที่ 8 เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยจากกระดังงาสงขลาไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS) สารที่พบมากสุดคือ β – Caryophylene และ Linalool โดยมี % Area เท่ากับ 14.10 และ 2.34 ตามลำดับ




**ภาพที่ 7 โครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาลนไฟ**

**ตารางที่ 9 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของกระดังงาสงขลาลนไฟ**

| SI. No | Compound | Peak areas ( % ) | Retention Time (RT) | Structure |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Cyclopentanal | 1.59 | 3.39 |  |
| 2 | D-Limenene | 0.11 | 3.62 |  |
| 3 | α-Ocimene | 0.10 | 13.57 |  |
| 4 | α-pinene | 81.15 | 14.93 |  |

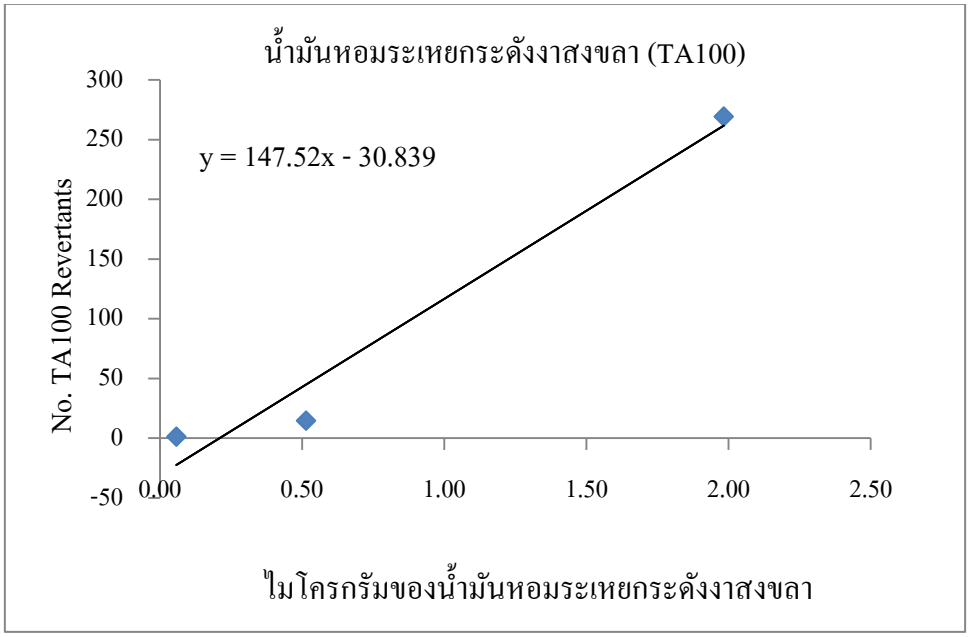
จากตารางที่ 9 เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยจากกระดังงาสงขลาไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS) สารที่พบมากสุดคือ α-pinene และ α-Ocimene โดยมี % Area เท่ากับ 81.15 และ 0.10 ตามลำดับ

## ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยวิธีเอมส์ (Ames Test)

จากการนำน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลา ก่อนลนไฟและหลังลนไฟ มาทำการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอมส์ แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบคือ *S.typhimurium* TA100 เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนับจำนวนโคโลนีที่เจริญขึ้นแล้วนำจำนวนโคโลนีที่ได้มาคำนวณหาดัชนีการกลายพันธุ์ (Mutagenicity Index; MI ) เพื่อดูจำนวนโคโลนีการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นโดยคำนวณจากจำนวนโคโลนีเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบสารสกัดหลังทำซ้ำ 3 ครั้ง หารด้วยจำนวนโคโลนีเฉลี่ยที่ได้จาก Negative Control (ใช้น้ำปราศจากเชื้อ) ที่ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยค่า MI ที่มีค่ามากกว่า 2 ขึ้นไปนั้นหมายถึงสารที่ทำการทดสอบนั้นมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ผลดังตารางที่ 10

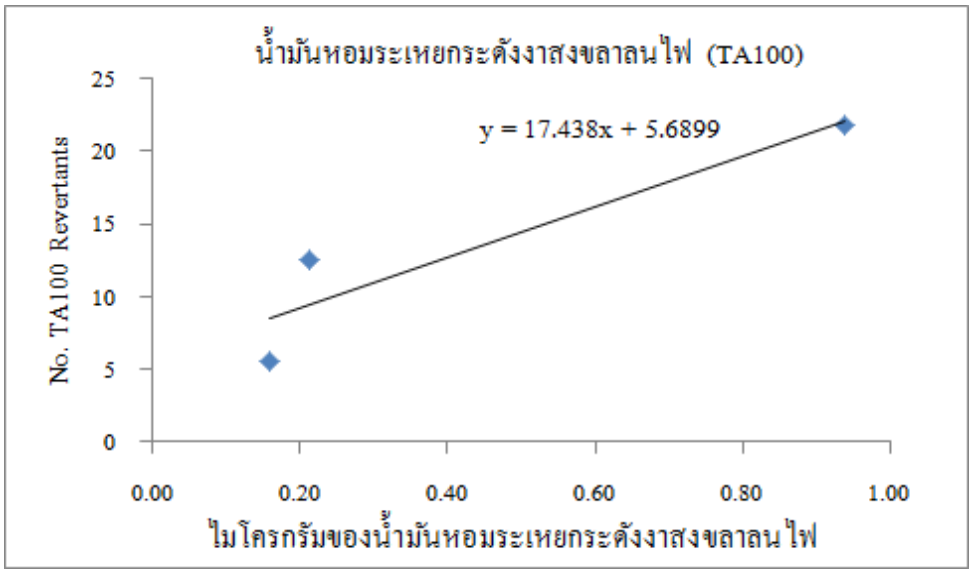
**ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอมส์โดยใช้แบคทีเรี *S.typhimurium* TA100**

| **น้ำมันหอมระเหย** | ***S.typhimurium* TA100** | |
|---|---|---|
| | **MI (mutagenicity index)** | |
| กระดังงาสงขลา | 0.06-1.98 | <2 |
| กระดังงาสงขลาลนไฟ | 0.16-0.94 | <2 |




**ภาพที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลา กับจำนวน TA100 Revertants**

จากผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของน้ำมันหอมระเหยจากดอกกระดังงาสงขลา เมื่อนำมาคำนวณหาดัชนีการกลายพันธุ์ (Mutagenicity Index; MI) พบว่า น้ำมันหอมระเหยดอกกระดังงาสงขลามีค่าดัชนีการกลายพันธุ์ น้อยกว่า 2 แสดงว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกกระดังงาสงขลาไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S.typhimurium* TA100




**ภาพที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาลนไฟกับจำนวน TA100 Revertants**

จากผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของน้ำมันหอมระเหยจากดอกกระดังงาสงขลาลนไฟ เมื่อนำมาคำนวณหาดัชนีการกลายพันธุ์ (Mutagenicity Index; MI) พบว่า น้ำมันหอมระเหยดอกกระดังงาสงขลาลนไฟมีค่าดัชนีการกลายพันธุ์ น้อยกว่า 2 แสดงว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกกระดังงาสงขลาลนไฟไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S.typhimurium* TA100

# บทที่ 5
# สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

## สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้ โดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำของสมุนไพร 2 ตัวอย่าง พบว่า การลนไฟของพืชสมุนไพรตัวอย่างมีผลต่อปริมาณที่เพิ่มขึ้นของน้ำมันหอมระเหย โดยน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาลนไฟ มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด มีปริมาณน้ำมันหอมระเหย (% yield) อยู่ที่ร้อยละ 0.515 และน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาลนไฟ มีปริมาณน้ำมันหอมระเหย (% yield) อยู่ที่ร้อยละ 0.169

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาก่อนลนไฟและหลังลนไฟ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีและแมสสเปกโทรสโกปี พบว่า การลนไฟของพืชสมุนไพรตัวอย่าง มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย โดยพบว่าน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาที่ไม่ผ่านการลนไฟ มีสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ $\beta$ – Caryophylene 14.10%, $\alpha$-Copaene 9.0%, Humulene 5.32%, Eugenol 3.09%, linalool 2.34% ส่วนกระดังงาสงขลาลนไฟมีสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ $\alpha$ – Pinene 81.15%, Cyclopentanal 1.59%, D-Limenene 0.11%, $\alpha$– Ocimene 0.10%

จากการศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ยืนยันให้เห็นว่าสารสกัดจากสมุนไพรกระดังงาสงขลา ก่อนลนไฟและหลังลนไฟ มีกลไกการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันไป โดยวิธี DPPH assay โดย พบว่า น้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลา แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า ($IC_{50}$ = 1,239.543±48.81 ppm) น้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาลนไฟ ($IC_{50}$ = 7,937.772±375.343 ppm) และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน วิตามินซี แล้วพบว่าน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาก่อนลนไฟและหลังลนไฟ มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 ได้น้อยกว่าว่าสารมาตรฐาน วิตามินซี ( $IC_{50}$ = 4.133 ppm)

สรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลามีความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี ขณะที่น้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาหลังลนไฟมีความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลง

เมื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยวิธีเอมส์ (Ames Test) ยืนยันให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยกระดังงาน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาก่อนลนไฟและหลังลนไฟ ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย TA 100 ซึ่งการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่บงชี้ให้เห็นถึงความปลอดภัยของกระดังงาสงขลาก่อนลนไฟและหลังลนไฟ

**ข้อเสนอแนะ**

ควรศึกษาวิธีการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระวิธีอื่นเพิ่มเติม ศึกษาฤทธิ์การต้านการก่อกลายพันธุ์ ว่ามีสารสำคัญชนิดใดที่มีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ ควรมีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์อื่นๆ ที่พบในน้ำมันหอมระเหยเพิ่มมากขึ้น

# บรรณานุกรม


กนกอร ระย้านิล. (2555). **สารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชวงศ์กระดังงา**.วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี). 4 (8), 96-111.

กัญญารัตน์ หลงเศษ. (2553). **การวิเคราะห์หาสารก่อกลายพันธุ์ในน้ำเสียของโรงงานในอุตสาหกรรมผลิตถุงมือยางในจังหวัดสงขลา**. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

กาญจนา ภิญโญภาพและคณะ. (2552). **การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชวงศ์กระดังงา**. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยราชมงคลธัญบุรี.

กาญจนา ภิญโญภาพ. (2551). **การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหย**. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยราชมงคลธัญบุรี.

จริยา เดชกุญชร. (2549**). ขนมไทยเล่ม 1** . กรุงเทพฯ: สถาพรบุ๊คส์.

ชาญฤทธิ์ สัพพัญญูและคณะ. (2553). **การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากพืชวงศ์กระดังงาสายพันธุ์ต่างๆ**. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชมงคลธัญบุรี.

ธิดารัตน์ แซ่ซื่อและวงศ์วิวัฒน์ ทัศนียกุล. (2556). **การศึกษาเปรียบเทียบวิธีทดสอบสารก่อการกลายพันธ์แบบมาตรฐานและแบบ Paper Disc Diffusion**. วารสารมหาวิทยาลัยขอนแก่น, 15(11), 1084-1098.

นุตติยา วีระวัธนชัย และคณะ. (2555). **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของฟลาโวนอยด์จากกระดังงาจีน.** วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 14(1), 23-29.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. ( 2554).**ทีแอลซี : วิธีอย่างง่ายในการวิเคราะห์เครื่องยาไทย.** (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

บังอร วงศ์รักษ์และศศิลักษณ์ ปิยะสวรรณ์. ( 2549). **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระผักพื้นบ้าน**. มหาวิทยาลัยมหิดล.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. (2556). **อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ**. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 21(3), 275-286.

เบญญา มโนชัยและคณะ. (2557). **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในส่วนต่างๆ ของน้อยหน่าจำนวน 6 พันธุ์.** วิทยาศาสตร์การเกษตร. 45(2)(พิเศษ), 217-220.

ปิยะ เฉลิมกลิ่น. (2551). **ไม้ดอกหอม.** กรุงเทพฯ: สายธุระกิจ.

พรีศักดิ์ วรสุนทโรสถ. (2544). **ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้19**. นนทบุรี: สหมิตรพริ้นติ้ง.

พัฒน์ พิชาน. (2546). **ไม้ดอกหอมตลอดปี.** กรุงเทพฯ: แนวเกษตร.

วรนิธิ์ สมุทรวนิช. (2539). **ขนมไทย.** กรุงเทพฯ: มติชน.

วาทินี เสล่ราษฎร์และจงกลณี จงอร่ามเรืองฤทธิ์. (2559). **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของทุเรียนเทศ.** มหาวิทยาลัยบูรพา.

ศรีสมร คงพันธุ์. (2531). **ขนมและน้ำผลไม้.** กรุงเทพฯ: สายส่องแสงแดด.

ศรีสมร คงพันธุ์. (2543). **ขนมไทย 2 .** กรุงเทพฯ: สายส่องแสงแดด.

เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล. (2550). **พรรณไม้สีเหลือง.** กรุงเทพฯ: เศรษฐศิลป์.

เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล. (2550). **ไม้ดอกหอม.** กรุงเทพฯ: เศรษฐศิลป์.

สุรางค์รัตน์ แดงจิระ. (2558). **องค์ประกอบทางเคมีการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของบอนหอม.** มหาวิทยาลัยบูรพา

โอภา วัชระคุปต์ และคณะ. (2550). **สารต้านอนมูลอิสระ.** (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: นิวไทยมิตรการพิมพ์.

อ้อมบุญ ล้วนรัตน์ .(2536). **การสกัดและตรวจสอบสารสำคัญจาก ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ.** (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

Muchjajib, U., & Muchjajib, S. (2011**). Effect of Picking Time on Essential Oil Yield of Ylang-Ylang (Canangaodorata).** In: Proceedings of Rajamangala Institute of Technology. Chiangmai, Thailand: 243-248.

Phan Minh Giang & Phan Tong Son (2016). **GC and GC-MS analysis of the fresh flower essential oil of Cananga odorata (Lam.) Hook. f. et Th. var. fruticosa (Craib) J. Sincl.** In: American Journal of Essential Oils and Natural Products . of Chemistry, Vietnam National University, Hanoi: 4(4): 09-11.

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก ก
# ภาพสุมนไพร

## ภาพสมุนไพร 2 ตัวอย่าง

| ชื่อสมุนไพร | ภาพสมุนไพร |
|---|---|
| กระดังงาสงขลา | |
| กระดังงาสงขลาลนไฟ | |

# ภาคผนวก ข
# ภาพทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์
# โดยวิธีเอมส์ (Ames Test)

## ภาพผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยวิธีเอมส์ (Ames Test)

### ตัวอย่างภาพทดสอบ Acetonitrile

**ผลการทดสอบน้ำมันหอมระเหยกระดังงาสงขลาและกระดังงาสงขลาลนไฟ TA100**

| กระดังงาสงขลา | กระดังงาสงขลาลนไฟ |
|---|---|
| | |
| | |
| | |

# ภาคผนวก ค
# สำเนาประกาศนียบัตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี

ร่วมกับ

มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา มหาวิทยาลัยมหามกุฏราชวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาจุฬาลงกรณราชวิทยาลัย และสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ

มอบหมายให้ [illegible]

มาลินี เข็มขาด

ได้เข้าร่วมนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ภาคบรรยาย

ใน การประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัย และงานสร้างสรรค์ระดับชาติ ๒๕๖๒ เรื่อง "งานวิจัย และงานสร้างสรรค์รับใช้สังคม"

ให้ไว้ ณ วันที่ ๑๒ กันยายน ๒๕๖๒

นายบัณฑิต ศรีสร
ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จุวลักษณ์ เผดิมสารสิน
นายกสภามหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี

# ประวัติผู้วิจัย

**ชื่อ-นามสกุล** นางสาวมาลินี เบ็ญพาด

**วัน เดือน ปี เกิด** 7 มกราคม พ.ศ. 2533

**ที่อยู่** 22 หมู่ 6 ตำบลหนองปรือ อำเภอหนองปรือ
จังหวัดกาญจนบุรี 71220

**ประวัติการศึกษา**

กำลังศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย
คณะวิทยาลัยมวยไทยศึกษาและการแพทย์แผนไทย
มหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง

ปริญญาตรี สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย พ.ศ. 2556
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

**ประสบการณ์การทำงาน**

2556-2558 นักวิชาการสาธารณสุข (แพทย์แผนไทย)
โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลคุ้งพยอม จังหวัดราชบุรี

2558-2559 ผู้ช่วยผู้อำนวยการสำนักงานการแพทย์แผนไทย
และการแพทย์ทางเลือก เขตสุขภาพที่ 5 จังหวัดราชบุรี
แพทย์แผนไทย สำนักงานสาธารณสุข จังหวัดราชบุรี

2559-2561 แพทย์แผนไทย โรงพยาบาลเลาขวัญ จังหวัดกาญจนบุรี