การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากบัวหลวง

Antimicrobial activity of *Nelumbo nucifera* Gaertn. extracts

ผศ. ดร. ปิยะวดี เจริญวัฒนะ

น.ส. สุมนา ปานสมุทร

ผศ. ดำรงค์ คงสวัสดิ์

นายอำนวย เพชรประไพ

งบประมาณ ประจำปี2552

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
สารบัญภาคผนวก	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	38
ผลและวิจารณ์	53
สรุปผลการทดลอง	73
เอกสารอ้างอิง	74
ภาคผนวก	77

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงชนิดตัวทำละลาย	12
2	ผลการทดสอบหากลุ่มสารสำคัญที่พบในสารสกัดจากใบและกลีบดอกบัว	58
3	น้ำหนักและปริมาณของสารสกัดหยาบบัวสายที่แยกได้เปรียบเทียบกับน้ำหนักกลีบดอกแห้ง	59
4	แสดงผลการทดสอบหมู่ฟังก์ชันไม่อิ่มตัว	60
5	แสดงน้ำหนัก crude และ silica gel G_{60} ที่ใช้ในColumn Chromatography	61
6	แสดงจำนวน Fraction ทั้งหมดที่ได้จาก Column Chromatography	62
7	แสดงการรวมกลุ่มสารของบัวสายฉลองขวัญที่ได้จาก Column Chromatography ในแต่ละ Fraction ด้วย TLC	62
8	แสดงการรวมกลุ่มสารของบัวสายมะเหมี่ยวที่ได้จาก Column chromatography ในแต่ละ Fraction ด้วย TLC	63
9	แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารตัวอย่างเทียบกับ Vitamin E	64
10	การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดบัวด้วยวิธี Paper Disc Diffusion	66
11	แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านเชื้อแบคทีเรียและรา ของสารสกัดบัวด้วยวิธี Paper Disc Diffusion	68

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของดอกบัวหลวง	10
2	คลื่นแสงในช่วง UV-Visible	17
3	ส่วนประกอบของเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์	18
4	โครงสร้างของ Flavan	22
5	การชีวสังเคราะห์กลุ่มสารฟลาโวนอยด์	22
6	สมการการเกิดปฏิกิริยา หลังจากการเติมสารต้านอนุมูล	30
7	เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	34
8	เชื้อราที่ใช้ทดสอบ	35
9	ลักษณะดอกบัวหลวงและบัวสายที่ใช้ในการทดสอบ	39
10	ใบ กลีบดอก และเกสร ของบัวที่นำมาสกัดสาร	44
11	ขั้นตอนการสกัดสารจากบัว	46
12	ตัวอย่างตำแหน่งการวางสารสกัด 4-2/H/DCM/E ทดสอบกับเชื้อ *B. subtilis*	50
13	ตัวอย่างตำแหน่งการวางสารสกัด 6-1/H/DCM/E ทดสอบกับเชื้อ *Lasiodiplodia* sp.	51
14	รูปแบบ Fraction ของสารสกัดบัวที่ได้จากการแยกด้วย TLC	54
15	สารสกัดที่ได้จากบัวพันธุ์ต่างๆ	55
16	การทดสอบสารกลุ่ม Flavonoids ที่ให้ผลบวกในสารสกัดจากบัวสาย	60
17	การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ของสารสกัดบัวโดยวิธี Paper Disc Diffusion	70
18	การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดบัว โดยวิธี Paper Disc Diffusion	71
19	การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ของสารสกัดบัว โดยวิธี Paper Disc Diffusion	72

สารบัญภาคผนวก

ตารางผนวก		หน้า
ก-1	ผลของสารสกัดบัวในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ต่อเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อทดสอบด้วยวิธี Paper Disc Diffusion	78
ก-2	ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของสารสกัดบัว ต่อเชื้อ *Bacillus subtilis*	80
ก-3	ผลของสารสกัดบัวในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ต่อเชื้อ *Staphylococus aureus* เมื่อทดสอบด้วยวิธี Paper Disc Diffusion	81
ก-4	ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของสารสกัดบัวต่อเชื้อ *Staphylococus aureus*	83
ก-5	ผลของสารสกัดบัวในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ต่อเชื้อ *Escherichia coli* เมื่อทดสอบด้วยวิธี Paper Disc Diffusion	84
ก-6	ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของสารสกัดบัวต่อ เชื้อ *Escherichia coli*	86
ภาคผนวก ข	อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	87

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากบัวหลวง

Antimicrobial activity of *Nelumbo nucifera* Gaertn. extracts

คำนำ

บัวเป็นพืชชนิดหนึ่งที่อยู่คู่คนไทยมาช้านาน บัวไม่ได้เป็นเพียงพืชธรรมดาที่ให้ประโยชน์ได้เฉพาะการนำไปใช้ไหว้พระ นำไปรับประทาน หรือนำไปปลูกไว้เพื่อประดับให้สวยงามเท่านั้น บัวยังสามารถใช้เป็นพืชสมุนไพรได้ นอกจากนี้บัวยังมีคุณลักษณะเด่นอื่นๆ และให้อรรถประโยชน์ได้อีกหลายด้านพืชบัวถูกค้นพบว่ามีมานานแล้วกว่า 3000-4000 ปี จากภาพเขียนสี และซากสถาปัตยกรรมโบราณของชาวอียิปต์บัวได้ถูกใช้พิธีกรรมที่ศักดิ์สิทธิ์มากมาย ในทุกศาสนาและทุกลัทธิต่างมีการกล่าวถึงเทพเจ้าหลายองค์กับบัว ดอกบัวจะถูกใช้ในพิธีกรรมและพิธีมงคลต่างๆ โดยเฉพาะศาสนาพุทธ จะมีที่กล่าวถึงบัวไว้ทั้งในพุทธประวัติ พุทธสุภาษิต และบทสวดมนต์ บัวยังมีความเกี่ยวข้องกับวิถีชีวิต วัฒนธรรม และประเพณีของหลายชาติ โดยเฉพาะชาติไทย ได้แก่ การนำไปใช้ตั้งชื่อหรือเรียกคนสถานที่ สิ่งของ อาทิ จังหวัดปทุมธานี อุบลราชธานี “กระทรวงบัวแก้ว” ซึ่งหมายถึงกระทรวงการต่างประเทศ และประเพณีโยนบัวรับบัว เป็นต้น ความสวยงามของบัวที่เป็นสากลยังได้ถูกถ่ายทอดไปสู่วรรณกรรมและศิลปกรรมในรูปแบบต่างๆมากมาย เช่น คำกลอน สุภาษิต ระบำดอกบัว ลวดลายบนหัวเสา ความต้องการบัวในตลาดโลกปัจจุบันมีอยู่มากและต่อเนื่อง ในฐานะที่ไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม การพัฒนาบัวให้เป็นพืชเศรษฐกิจหลักที่สำคัญ จึงมีความเป็นไปได้หากทุกฝ่ายร่วมมือและให้ความสำคัญอย่างจริงจัง
(http://www.kmitl.ac.th/agridata/Lotus/article/Lotus.pdf)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ประชากรส่วนใหญ่มีอาชีพด้านเกษตรกรรม ซึ่งมีรายได้หลักจากการส่งออกสินค้าทางการเกษตรเป็นมูลค่าสูงถึง 662,229 ล้านบาท ในปี 2552 (http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php) พืชที่ส่งออกและสร้างรายได้ให้กับประเทศไทยเป็นอย่างมาก ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ถั่วลิสง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง มันสำปะหลัง อ้อย ปาล์มน้ำมัน ยางพารา สับปะรด ลำใย ทุเรียน มังคุด เงาะ กาแฟ กล้วยไม้ กระเทียม ขิง และพริกไทย เป็นต้น (http://www.agriinfo.doae.go.th/5year/export/exportpage.pdf) ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ทำความเสียหายในทุกพื้นที่ที่มีการปลูกพืชในปัจจุบัน เกษตรกรมักนิยมใช้สารเคมีในการป้องกันและกำจัด ซึ่งสารเหล่านี้มีการนำเข้ามาเพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร และลดการสูญเสียผลผลิตทางการเกษตร และมักก่อให้เกิดปัญหาในด้านความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม นอกจากนี้สารเคมีบางชนิดไม่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติก่อให้เกิดการสะสมในดิน พืชและน้ำและเกิดผลกระทบต่อมนุษย์ทางห่วงโซ่อาหาร ปัจจุบันสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เริ่มเข้ามามีบทบาทสำคัญในระบบเกษตรกรรม โดยเฉพาะการปลูกพืชระบบอินทรีย์ ได้มีการนำมาศึกษาวิจัยและพบว่าสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งศัตรูพืช รวมทั้งส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากสิ่งมีชีวิต ในการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำเป็นต้องอาศัยเทคนิค เครื่องมือในการทดสอบฤทธิ์ และวิธีการแยกสารให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาว่าองค์ประกอบใดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ นอกจากนั้นยังต้องมีการปรับปรุงโครงสร้างของสารบางส่วนเพื่อทำให้สารนั้นมีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้นซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้นต่อไปในอนาคต และยังช่วยลดปัญหาผลกระทบจากการตกค้างของสารเคมีทางการเกษตรได้อีกด้วย

จากการศึกษาวิจัยพบสารชนิดต่างๆ ในส่วนประกอบของบัวหลวง ที่มีสรรพคุณในการบำรุงร่างกายหรือนำมาปรุงเป็นยารักษาโรคได้ เช่น ส่วนต่างๆ ของบัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) คือ ดอก ใบ ก้านใบ ฝักบัว เมล็ด และโดยเฉพาะดีบัว มีสารอัลคาลอยด์ (Alkaloids) หลายชนิด ที่มีฤทธิ์ต่อการขยายเส้นเลือดที่เลี้ยงหัวใจ เกสรบัว (ตัวผู้) พบสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รากบัว เหง้าบัว และเปลือกผล พบสารพวกแทนนิน (Tannin) เป็นสารฝาดสมานที่มีฤทธิ์ช่วยยับยั้งอาการท้องเดิน และรากบัวมีสารพวกแคลเซียม (Calcium) ช่วยบำรุงร่างกาย เมล็ดบัว มีสารไขมัน (Lipid) ช่วยเพิ่มพลังงาน บำรุงไขข้อและเอ็น (http://www.kmitl.ac.th/agridata/Lotus/article/Lotus.pdf) การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากบัวหลวงในประเทศไทย ทำให้ทราบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของบัวหลวง ในการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญบางชนิด
2. เป็นการนำสารที่สกัดได้จากธรรมชาติใช้ทดแทนหรือเพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมี
3. เพื่อพัฒนาพืชพื้นเมืองมาใช้ในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์

การตรวจเอกสาร

บัวเป็นพืชไม้น้ำ ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์มานาน ขยายพันธุ์ได้ง่ายรวดเร็วและจำนวนมาก ดอกบัวหลวงถือได้ว่าเป็นสัญลักษณ์ทางพุทธศาสนา เป็นดอกไม้ใช้บูชาพระ และพิธีการต่าง ๆ นักพฤษศาสตร์ได้จัดสกุล (genus) ของไม้น้ำที่คนไทยเรียกว่า “บัว” หรืออุบลชาติ ไว้ในวงศ์ Nymphaeaceae เพราะลักษณะของใบและดอกที่ชูช่ออยู่เหนือน้ำ และ ความงามของดอกบัวที่เบ่งบานประดุจความงามของหญิงสาวหรือเจ้าสาว คำว่า “Nymph” มาจากรากศัพท์ภาษาอังกฤษแปลว่า “สาวน้อย” (A BEAUTIFUL YOUNG WOMAN) หรือ “แม่เทพธิดาที่อยู่ในน้ำ” และจากลักษณะเด่นอื่นๆ นอกเหนือจากความงามของบัว อาทิ บัวมีหลากสีหลายพันธุ์ ดอกมีสารพัดสี บางพันธุ์มีดอกสีน้ำเงิน ซึ่งพบได้ยากในไม้ดอกอื่นๆ แม้แต่ในดอกเดียวกันก็อาจมีหลายสี หรือบางพันธุ์มีการเปลี่ยนสีของดอกไปเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการบาน ดอกบัวยังไม่เหมือนพืชชนิดอื่นอีกที่เมื่อดอกบานแล้วก็บานเลย แต่ดอกบัวจะบานแล้วก็หุบเมื่อหุบแล้วก็บานได้ใหม่อีก ดอกบัวบางพันธุ์ยังมีกลิ่นหอม นอกจากนี้บัวยังเป็นพืชที่ปลูกได้ง่ายและดูแลง่าย สามารถขึ้นเองได้ตามธรรมชาติ สมญาของบัวที่ได้รับว่าเป็น “ราชินีแห่งไม้น้ำ” ทั้งมวล จึงมีความเหมาะสมเป็นอย่างยิ่ง (http://www.kmitl.ac.th/agridata/Lotus/article/Lotus.pdf)

1. การจำแนกประเภทของบัว

เดิมนักพฤกษศาสตร์ได้รวมบัวหลวงและบัวสายไว้ในวงศ์ Nymphaeaceae ซึ่งมี 7 สกุล คือ *Nymphaea, Nelumbo, Victoria, Barclaya, Nyphar, Euryale* และ *Ondinea* ขณะนี้นักพฤกษศาสตร์ได้แยกบัวหลวงออกเป็นวงศ์ Nelumbonaceae ส่วนสกุลอื่นๆ นั้น ยังคงอยู่ในวงศ์ Nymphaeaceae (สุชาดา, 2540)

การจำแนกหรือแบ่งประเภทของบัวมีหลายวิธี (http://www.nanagarden.com)

1.1 การจำแนกตามถิ่นกำเนิด และการเจริญเติบโต แบ่งได้ 2 จำพวก คือ

1.1.1 บัวที่เกิดและเจริญเติบโตในเขตอบอุ่นและเขตหนาว (Hardy Type หรือ Hardy Water Lily) เช่น ยุโรป อเมริกาเหนือ ภาคใต้ของอเมริกาใต้ ตอนเหนือของอินเดีย จีน และออสเตรเลีย บัวประเภทนี้มีเหง้าสะสมอาหารอยู่ในดิน ในฤดูหนาวที่น้ำกลายเป็นแผ่นน้ำแข็ง บัวจะทิ้งใบ และอาศัยอาหารในเหง้าเลี้ยงตัวเอง เมื่อเข้าฤดูใบไม้ผลิ น้ำแข็งละลาย ก็จะเจริญแตกหน่อต้นใหม่ และจะเจริญเติบโตออกดอกออกผล หมุนเวียนอยู่เช่นนี้เรื่อยไป นักพฤกษศาสตร์จัดให้บัวประเภทนี้ อยู่ในกลุ่ม Castalia Group หรือ อุบลชาติประเภทยืนต้น

1.1.2 บัวที่เกิดและเจริญเติบโตในเขตร้อน (Tropical Type หรือ Tropical Water Lily) เช่น ทวีปเอเชียตอนกลาง และตอนใต้ แอฟริกา ออกสเตรเลียตอนเหนือ อเมริกากลาง และอเมริกาใต้ บัว

ประเภทนี้กำเนิด และเจริญเติบโตได้ในเขตร้อนเขตเดียว ไม่สามารถอยู่ได้ในเขตหนาว นักพฤกษศาสตร์จัดให้บัวประเภทนี้ อยู่ในกลุ่ม Lotus Group หรือ อุบลชาติประเภทล้มลุก

1.2 การจำแนกบัวตามสกุล โดยทั่วไปนักพฤกษศาสตร์ได้จัดแบ่งบัว ไว้เป็น 3 สกุล ได้แก่

1.2.1 สกุลนีลัมโบ (*Nelumbo*) บัวหลวง หรือปทุมชาติ (*Nelumbo*) บัวหลวงมีชื่อสามัญ คือ Lotus มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Nelumbo nucifera* Gaertn. อยู่ในวงศ์ Nelumbonaceae ลักษณะเด่นคือ ใบและดอกจะชูเหนือน้ำ บัวพวกนี้มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนแถบเอเชีย เช่น จีน อินเดียและไทย บัวหลวงทุกพันธุ์จึงปลูกได้ในไทย มีลำต้นใต้ดินแบบเหง้าและไหลซึ่งเมื่อยังอ่อนจะมีลักษณะเรียวยาว เมื่อโตเต็มที่จะอวบอ้วนเนื่องจากสะสมอาหารไว้มาก มีข้อปล้องเป็นที่เกิดของราก ใบและดอกเกิดจากหน่อที่ข้อปล้องแล้วเจริญขึ้นมาที่ผิวน้ำหรือเหนือน้ำ ใบเป็นใบเดี่ยวมีลักษณะกลมใหญ่ สีเขียวอมเทา ขอบใบยกผิวด้านบนมีขนอ่อนๆ ทำให้เมื่อโดนน้ำจะไม่เปียกน้ำ เมื่อใบยังอ่อนใบจะลอยปิ่มน้ำ ส่วนใบแก่จะชูพ้นน้ำ ก้านใบและก้านดอกมีหนาม ดอกเป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ชูสูงพ้นผิวน้ำ มีทั้งดอกป้อมและดอกแหลม บานในเวลากลางวันมีกลิ่นหอมอ่อนๆ ประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 4-6 กลีบ ด้านนอกมีสีเขียว ด้านในมีสีเดียวกับกลีบดอก กลีบดอกมีทั้งชนิดดอกซ้อนและไม่ซ้อน สีของกลีบดอกมีทั้งสีขาว ชมพู หรือเหลือง แตกต่างกันแล้วแต่ชนิดพันธุ์ บัวในสกุลนี้เป็นบัวที่รู้จักกันดีเพราะเป็นบัวที่มีดอกใหญ่นิยมนำมาไหว้พระ และใช้ในพิธีทางศาสนา เหง้าหรือที่มักเรียกกันว่ารากบัวและไหลบัวรวมทั้งเมล็ดสามารถนำมาเป็นอาหารได้

1.2.2 สกุลนิมเฟีย (*Nymphaea*) อุบลชาติ หรือ บัวสาย ได้แก่ บัวฝรั่ง บัวผันบัวเผื่อน และจงกลนี ชื่อสามัญว่า Waterlily จัดอยู่ในวงศ์ Nymphaeacea ลักษณะเด่นคือ ใบจะลอยแตะผิวน้ำ และไม่มีหนาม ซึ่งแยกเป็น 2 ชนิด คือ พวกบานกลางวัน ได้แก่ บัวผันฝรั่ง (*Nymphaea capensis* var. zanzibariensis) บัวผันและบัวเผื่อน (*Nymphaea nouchali* หรือ *Nymphaea stella*) พวกบานกลางคืน ได้แก่ บัวสาย (*Nymphaea pubescens*) หรือบัวกินสาย (อุบล หรืออุบลชาติ) ส่วนจงกลนี (*Nymphaea lotus* var. pubescens) เป็นบัวพันธุ์พื้นเมืองของไทย จัดอยู่ในกลุ่มอุบลชาติลักษณะใบรีมีหยัก ออกดอกดก และทยอยออก ดอกตูมป้อม สีชมพู กลีบดอกมาก ดอกลอยเหนือผิวน้ำ บานแล้วไม่หุบ ต้องการน้ำลึก (ประมาณ 60 ซม.) เพราะถ้าตื้นมากบัวจะไม่ออกดอก บัวสกุลนิมเฟียมีลำต้นใต้ดินเป็นหัวหรือเหง้า ใบและดอกเกิดจากตาหรือหน่อและเจริญขึ้นมาที่ผิวน้ำด้วยก้านส่งใบและยอด บางชนิดมีใบใต้น้ำ ใบเป็นใบเดี่ยว มีขอบใบทั้งแบบเรียบและแบบคลื่น ผิวใบด้านบนเรียบเป็นมัน ด้านล่างมีขนละเอียดหรือไม่มี ดอกเป็นดอกเดี่ยวมีทั้งชนิดที่บานกลางคืนและบานกลางวัน บางชนิดมีกลิ่นหอม มีสีสันหลากหลายแตกต่างกันไป

1.2.3 สกุลวิกตอเรีย (*Victoria*) บัววิกตอเรีย หรือบัวกระด้ง จัดอยู่ในวงศ์ Victoria เป็นไม้น้ำพื้นเมืองของทวีปอเมริกาใต้ แต่ถูกนำไปเพาะบนเกาะอังกฤษได้สำเร็จ และถูกขนานนามว่า “บัววิคตอเรีย” เพื่อเป็นเกียรติแก่สมเด็จพระนางเจ้าวิคตอเรีย จัดเป็นบัวที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีลำต้นใต้ดินเป็นหัวใหญ่ ใบเป็นใบเดี่ยวมีขนาดใหญ่ประมาณ 6 ฟุต ลอยบนผิวน้ำ ใบอ่อนมีสีแดงคล้ำเมื่อแก่จะ

เปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ขอบใบยกขึ้นตั้งตรง มีหนามแหลมตามก้านใบและผิวใบด้านล่าง ดอกเป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ ดอกดกมีกลิ่นหอม ทยอยออกดอก ดอกตูมจะป้อมมาก กลีบดอกชั้นนอกมีหนามแหลม ปกติดอกบานตอนกลางคืนและมีกลิ่นหอม ดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยงจำนวน 4 กลีบ ด้านนอกมีสีเขียวด้านในสีเดียวกับกลีบดอก เมื่อแรกที่ดอกบาน จะมีสีขาว แล้วจึงเปลี่ยนเป็นสีอื่น เช่น สีชมพู สีแดงเข้ม ต่อไป

ในแต่ละสกุลสามารถจำแนกได้หลายชนิด สำหรับในประเทศไทยชนิดของบัวที่ปลูกเป็นการค้ามี 6 ชนิด

1. บัวหลวง : (*Nelumbo nucifera*) อยู่ในสกุลปทุมชาติ ลักษณะใบชูเหนือน้ำ เจริญเติบโตโดยมี ไหลชอนไชไปใต้พื้นดิน พันธุ์ของบัวหลวงที่นิยมปลูกในปัจจุบัน ได้แก่ พันธุ์ฉัตรขาว ฉัตรแก้ว และฉัตรแดง

2. บัวฝรั่ง : (*Zephyranthes rosaw*) อยู่ในสกุลปทุมชาติ ลักษณะคล้ายบัวหลวง ต้นอ่อน เจริญเติบโตโดยสร้างลำต้น หรือเหง้า เจริญตามแนวนอนใต้ผิวดิน ลักษณะใบมีทั้งขอบเรียบและขอบใบจัก

3.บัวผัน บัวเผื่อน : (Nymphacea lotus) อยู่ในสกุลอุบลชาติ ต้นที่งอกจากเมล็ดจะเจริญตามแนวดิ่งขึ้นสู่ผิวดิน แล้วแตกก้านใบบนผิวดินดอกชูพ้นน้ำ บานในเวลาเช้าหรือกลางวัน และหุบตอนเย็น เป็นบัวชนิดที่ขยายพันธุ์ได้ช้า

4. บัวสาย : (Nymphacea lotus) อยู่ในสกุลอุบลชาติ มีหัวกลมๆ สายขนาดปลายนิ้วก้อย มีขนเล็กน้อย ใบมน ขอบใบจัก ดอกบานกลางคืน และหุบเวลาเช้า

5.บัวจงกลนี : (Nymphacea lotus) อยู่ในสกุลอุบลชาติ มีเหง้าเจริญเติบโตในแนวดิ่ง เมื่อเหง้าแก่เต็มที่จะสร้างหัวเล็กๆรอบเหง้า เมื่อหัวแก่จะเจริญเป็นต้นใหม่ขึ้นมาข้างๆต้นแม่

6. บัวกระด้ง : (*Victoria amazonica*) ใบมีขนาดใหญ่ กลมคล้ายกระด้ง

2. ลักษณะของบัวหลวง

บัวหลวงจัดอยู่ในวงศ์ Nelumbonaceae ซึ่งมีเพียงสกุล *Nelumbo* เท่านั้น บัวสกุลนี้แบ่งออกเป็น 2 ชนิด (species) คือ บัวหลวงซีกโลกตะวันออก (lotus, sacred lotus) ที่ให้ดอกสีขาว และสีชมพู-แดง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nelumbo nucifera* Gaertn. และบัวหลวงซีกโลกตะวันตก หรือบัวหลวงอเมริกัน (american lotus, water chinquapin) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nelumbo lutea* Pers. (เสริม ลาภ, 2549)

บัวหลวง บัวก้านแข็ง หรือปทุมชาติ (lotus) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nelumbo nucifera* Gaertn. ชื่อสามัญคือ lotus, sacred lotus ชื่อพื้นเมืองคือ บุณฑริก ปุณฑริก ปทุม ปัทมา โกกระณต สัตตบุษย์ บัวฉัตรขาว สัตตบงกช บัวฉัตรชมพู โช้ค บัวอุบล มีถิ่นกำเนิดแถบเอเชีย

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ต้นเป็นไม้โผล่เหนือน้ำ อายุหลายปี ลำต้นมีทั้งที่เป็นเหง้าใต้ดิน และเป็นไหลเหนือดินใต้น้ำ ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ ใบรูปไข่ค่อนข้างกลม ขนาด 15-40 เซนติเมตร ขอบใบเรียบและเป็นคลื่นเล็กน้อย แผ่นใบเรียบ สีเขียวและมีนวลเคลือบ ก้านใบมีหนามเป็นตุ่มเล็กๆ ก้านใบติดกับแผ่นใบ ด้านหลังใบ (peltate leaf) โคนก้านใบมีหูใบ (stipule) 2 อัน ก้านใบกลมเรียวแข็งส่งใบให้เจริญที่ผิวน้ำหรือเหนือน้ำ ดอกสีชมพู ขาว มีกลิ่นหอม ดอกออกจากเหง้าใต้ดินตรงซอกใบ ก้านดอก (peduncle) ส่งดอกให้ขึ้นมาบานเหนือน้ำ ก้านดอกและก้านใบมีลักษณะเหมือนกัน ภายในก้านใบ และก้านดอก มีน้ำยางใส เมื่อถูกอากาศแล้วเป็นสีคล้ำ นอกจากนี้ยังมีท่ออากาศ (air canal) ใหญ่ 4 – 6 ช่อง ดอกเป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ สมบูรณ์เพศ (perfect flower) ก้านดอกสีเขียว อวบกลมส่งดอกชูขึ้นเหนือน้ำ กลีบเลี้ยง (sepal) สีเขียว มี 4-5 กลีบ ขนาดเล็ก กลีบดอก (petal) จำนวนมากสีขาว สีชมพู และสีเหลือง (ซึ่งไม่มีชนิดนี้ในเมืองไทย) เรียงซ้อนกันหลายชั้น ลักษณะของกลีบดอกเป็นรูปไข่กลับ เกสรเพศผู้จำนวนมากติดกับฐานรองดอกในตำแหน่งที่ต่ำกว่าเกสรเพศเมีย อับเรณู (anther) สีเหลืองมี 4 อัน ลักษณะเรียวยาว ปลายอับเรณูมีระยางค์สีขาวหรือขาวอมเหลือง บัวชนิดนี้บางพันธุ์มีเกสรเพศผู้ธรรมดา (stamen) เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminode) เกสรเพศผู้ที่เหมือนกลับดอก (stamen petaloid) และเกสรเพศผู้ที่เหมือนกลีบดอกและเป็นหมัน (staminode petaloid) เกสรเพศเมียประกอบด้วยรังไข่อยู่เหนือชั้นของกลีบดอกและเกสรเพศผู้ รังไข่มีคาร์เพล (carpel) แยกออกจากกัน โดยแต่ละคาร์เพลฝังตัวอยู่ในตอนบนของฐานรองดอก (receptacle) ที่ขยายใหญ่เรียกว่า torus ก้านชูเกสรและยอดเกสรเพศเมียชนาดเล็กอยู่ทางด้านบน ในรังไข่แต่ละอันมีไข่อ่อนเพียง 1 อัน ติดอยู่ที่ผนังส่วนบนของรังไข่ ผลเป็นผลกลุ่ม (aggregate fruit) ประกอบด้วยเมล็ดเดี่ยวเปลือกแข็ง (nut) จำนวนมาก เรียกว่า ฝักบัว (torus or thalamus) ผลย่อยมีรูปร่างคล้ายรูปไข่ เมล็ดมีเปลือกเมล็ดชั้นนอกอ่อนนุ่ม ไม่มีเอนโดสเปิร์ม มีใบเลี้ยงหนา 2 ใบ นำมารับประทานได้ ต้นอ่อน (embryo) ใบนำมาสกัดใช้เป็นยาได้ เป็นที่สะสมอาหารเมล็ดจะงอกส่วนของ epicotyl ออกมาก่อน ส่วนใบเลี้ยงยังคงอยู่ในเมล็ดซึ่งฝังอยู่ใต้ดิน (hypogeal-germination) สภาพการปลูกจะชอบดินเหนียวที่มีอินทรียวัตถุ เจริญได้ดีที่ระดับน้ำ 15-30 เซนติเมตร มีแสงเต็มวัน และมีการขยายพันธุ์ โดยการแยกเหง้า

2.2 สารประกอบและสรรพคุณทางยาที่พบในบัวหลวง

จากการศึกษาวิจัยพบสารชนิดต่างๆ ในส่วนประกอบของบัวหลวง ที่มีสรรพคุณในการบำรุงร่างกายหรือนำมาปรุงเป็นยารักษาโรคได้ เช่น

ส่วนต่างๆ ของบัวหลวง (โดยเฉพาะ *Nelumbo nucifera* Gaertn.) คือ ดอก ใบ ก้านใบ ฝักบัว เมล็ด และโดยเฉพาะดีบัว มีสารอัลคาลอยด์ (Alkaloids) หลายชนิด ที่มีฤทธิ์ต่อการขยายเส้นเลือดที่เลี้ยงหัวใจ

เกสรบัว (ตัวผู้) พบสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

รากบัว เหง้าบัว และเปลือกผล พบสารพวกแทนนิน (Tannin) เป็นสารฝาดสมานที่มีฤทธิ์ช่วยยับยั้งอาการท้องเดิน และรากบัวมีสารพวกแคลเซียม (Calcium) ช่วยบำรุงร่างกาย

เมล็ดบัว มีสารไขมัน (Lipid) ช่วยเพิ่มพลังงาน บำรุงไขข้อและเอ็น

สรรพคุณทางยาของบัวหลวงโดยทั่วไป บัวหลวง จะเป็นบัวที่เกือบทุกส่วนจะมีสรรพคุณทางยา ดังนี้

ใบอ่อน รสฝาดเปรี้ยว บำรุงร่างกายให้ชุ่มชื่น

ใบแก่ รสฝาดเปรี้ยวเมาเล็กน้อย แก้ไข้ บำรุงโลหิต สูบแก้ริดสีดวงจมูก หวัดเรื้อรัง ลดเสมหะ ลดความดันโลหิต และไขมันในเส้นเลือด (โคเรสเตอรอล) ถ้าเผาอบแล้วบดละเอียดผสมพิมเสน ใช้แทรกยาหอม

ดอก รสฝาดหอม สรรพคุณแก้ไข้ ไข้มีพิษร้อน แก้ธาตุพิการ แก้เสมหะและโลหิต บำรุงหัวใจ บำรุงโลหิต และบำรุงครรภ์ทำให้คลอดบุตรง่าย

เกสร รสฝาดหอมเย็น แก้ไข้ ไข้มีพิษ ไข้รากสาด แก้เสมหะ แก้อ่อนเพลีย แก้คลื่นเหียน ใช้เป็นยาบำรุงครรภ์ เกสรตัวผู้รสฝาดสมาน มีกลิ่นหอม ใช้ปรุงเป็นยาหอม บำรุงหัวใจ บำรุงประสาท และชูกำลังทำให้ชุ่มชื่น

เมล็ด รสหวานมัน เย็น บำรุงกำลัง ไขข้อ เส้นเอ็นและบำรุงประสาท ทำให้กระชุ่มกะชวย แก้ร้อนใน กระหายน้ำ แก้เสมหะ พุพอง ดีพิการ อาเจียน อ่อนเพลีย ช่วยเพิ่มพลังงานและไขมันในร่างกาย แต่แสลงกับโรคไอมีเสมหะ

ดีบัว รสขม ขยายหลอดเลือดหัวใจ แก้กระหายน้ำ แก้น้ำกามเคลื่อนขณะหลับ และแก้อาเจียนเป็นโลหิต

ก้านดอก รสเย็นเมา ตากแห้งสูบแก้ริดสีดวงจมูก

ก้านใบ มีฤทธิ์เป็นยาห้ามเลือดหรือทำให้เลือดหยุด

ราก รสหวานหอม แก้ไข้ แก้ท้องเสีย บำรุงกำลัง บำรุงเพลิงธาตุ แก้เสมหะ แก้กระหาย ต้มเป็นน้ำกระสายแก้ร้อน อ่อนเพลีย แก้อาเจียน พุพองและละลายยาแก้สะอึก

เหง้า รสหวานเย็น*มัน* แก้ลงท้อง บำรุงกำลัง แก้ร้อนในกระหายน้ำ แก้เสมหะ แก้ฝีพุพอง ดีพิการ และแก้อาเจียนใช้เหง้าบัวต้มกับน้ำ ดื่มแก้อาการไอขับเสมหะ ลดอาการอ่อนเพลีย ระงับอาการท้องร่วง ธาตุไม่ปกติในเด็ก

ทั้งต้น ใช้แก้พิษจากการรับประทานเห็ดพิษ แบะพิษจากอาการพิษสุราเรื้อรัง โดยใช้ทั้งต้นขนาด 10-15 กรัม นำไปต้มให้รับประทาน

พิกัดยาไทยที่เกี่ยวกับบัว

“พิกัดยา” ซึ่งหมายถึงการจัดยาหรือจำกัดชนิดของยาตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป จัดรวมกันเข้าเป็นหมวดหมู่ โดยมีสัดส่วนของยาแต่ละชนิดเท่ากันหรือเสมอภาคกัน รวมเรียกเป็นชื่อเดียว เพื่อ

สะดวกในการจดจำ ในการเขียนตำรับยา และในการปรุงยาพิกัดยาที่พบบ่อยๆ และมีบัวหรือส่วนประกอบของบัวเป็นยา ได้แก่ พิกัดเกสรทั้งห้า พิกัดบัวทั้งห้า และพิกัดบัวพิเศษ

พิกัดเกสรทั้ง 5 ,เกสรทั้ง 7 และเกสรทั้ง 9

พิกัดเกสรทั้ง 5 หรือพิกัดเบญจเกสร หมายถึง เกสรดอกมะลิ พิกุล บุนนาค สารภี และเกสรดอกบัวหลวง ส่วนพิกัดทั้ง 7 หรือพิกัดสัตตะเกสร เพิ่มเกสรดอกกระดังงา และดอกจำปา และพิกัดเกสรทั้ง 9 หรือพิกัดเนาวเกสร เพิ่มดอกลำเจียก และดอกลำดวน รสหอมเย็น เป็นตัวยาที่มีสรรพคุณรวมเป็นยาบำรุงหัวใจ จึงใช้เป็นตัวยาประกอบยาหอม เพราะช่วยบำรุงหัวใจให้ชุ่มชื่น แก้ลมวิงเวียน ยังแก้ร้อนในกระหายน้ำ ชูกำลัง แก้อ่อนเพลีย ทำให้เจริญอาหาร แก้ไข้เพ้อกลุ้ม แก้ไข้เพื่อปถวีธาตุ(ธาตุดิน) แก้โรคตา แก้พิษโลหิต และกลิ่นสาบสางในร่างกาย

พิกัดบัว (บัวน้ำ) ทั้ง 5 ประกอบด้วย บัวสัตตบุษย์ บัวสัตตบรรณ บัวลินจง บัวจงกลนี และบัวนิลุบล พิกัดบัวทั้ง 5 นี้ มีรสฝาดหอมเย็น สรรพคุณรวมกันเป็นยาบำรุงหัวใจ ช่วยชูกำลัง แก้ลมพานไส้ แก้อุจจาระธาตุ แก้ไข้เพื่อลมและโลหิต แก้ไข้รากสาด และบำรุงครรภ์รักษา

พิกัดบัวพิเศษ 6 อย่าง ประกอบด้วยบัวหลวงแดง บัวหลวงขาว บัวสัตตบงกชแดง บัวสัตตบงกชขาว บัวเผื่อน และบัวขม พิกัดบัวพิเศษนี้ มีรสฝาดเย็น สรรพคุณรวมกันในการชูกำลัง บำรุงหัวใจ แก้ลมพานไส้ แก้อุจจาระธาตุ แก้ไข้ แก้โลหิต
(http://www.kmitl.ac.th/agridata/Lotus/article/Lotus.pdf)

2.3 การจำแนกพันธุ์บัวหลวง สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. บัวหลวงสีขาว มี 2 พันธุ์ คือ

- พันธุ์ Hindu lotus ดอกมีขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ ปลายเรียว กลีบดอกชั้นเดียว ได้แก่ บุณฑริก ปุณฑริก บัวหลวงขาว บัวแหลมขาว
- พันธุ์ Magnolia lotus ดอกมีขนาดใหญ่ ดอกตูมทรงป้อม กลีบดอกซ้อนกันแน่น ได้แก่ สัตตบุษย์ บัวฉัตรขาว บัวป้อมขาว บัวหลวงขาวซ้อน

2. บัวหลวงพันธุ์สีชมพู มี 3 พันธุ์ คือ

- พันธุ์ East Indian Lotus ดอกมีขนาดใหญ่ ดอกตูมรูปไข่ ปลายเรียว กลีบดอกชั้นเดียว ได้แก่ ปทุม ปัทมา โกกระณต บัวหลวงชมพู บัวแหลมแดง
- พันธุ์ Roseum Plenum ดอกมีขนาดใหญ่ ดอกตูทรงป้อม กลีบดอกซ้อนกันแน่น ได้แก่ สัตตบงกต บัวหลวงป้อมแดง บัวฉัตรแดง
- พันธุ์บัวเข็มชมพู ดอกมีขนาดเล็ก ดอกตูมเรียวเป็นรูปไข่ กลีบดอกชั้นเดียว ได้แก่ บัวปักกิ่งชมพู บัวไต้หวัน บัวหลวงจีนชมพู

พันธุ์บัวหลวงที่พบในประเทศไทย

1. บัวพันธุ์ดอกสีชมพู (บัวแหลมชมพู) มีชื่อว่า ปทุม ปัทมา โกกระนต หรือ โกกนุต ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ ปลายเรียวสีชมพู กลีบดอกชั้นนอกมี 4-5 กลีบ รูปไข่มีขนาดเล็ดเรียงตัวกัน 2 ชั้น ส่วนกลางของกลีบมีรูปร่างโค้งป่อง ตรงกลางสีชมพูอมเขียว ส่วนกลีบดอกชั้นกลางและชั้นในสีชมพูเข้ม โคนกลีบดอกสีขาวนวล มีประมาณ 13-14 กลีบ เรียงตัวเป็นชั้น ประมาณ 3 ชั้น อยู่โดยรอบฐานดอก กลีบชั้นนอกและชั้นในมีสีและรูปร่างคล้ายชั้นกลางแต่เล็กกว่ากลีบในชั้นกลาง

2. บัวหลวงพันธุ์ดอกสีขาว (บัวแหลมขาว) มีชื่อว่า บุณฑริก หรือ ปุณฑริก ดอกขนาดใหญ่เป็นรูปไข่ ปลายเรียว คล้ายบัวพันธุ์ปทุม ดอกมีสีขาวประกอบด้วยกลีบดอกชั้นนอกสีขาวอมเขียว ส่วนกลีบในชั้นกลางและชั้นในสีขาวปลายกลีบดอกสีชมพูเรื่อๆ รูปร่างของกลีบและการเรียงตัวของกลีบดอกคล้ายดอกบัวพันธุ์ปทุม

3. บัวหลวงชมพูซ้อน (บัวฉัตรชมพู) มีชื่อว่า สัตตบงกช ดอกมีขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ทรงป้อม สีชมพู ประกอบด้วยกลีบนอกเป็นรูปรี มี 4-7 กลีบ กลีบเล็กเรียนซ้อนกันเป็นชั้น 2-3 ชั้น สีเขียวอมชมพู กลีบในสีชมพูตลอด ส่วนโคนกลีบที่ติดกับฐานรองดอกมีสีขาวอมเหลือง กลีบในมีประมาณ 12-16 กลีบ กลีบในชั้นนอกและชั้นในมีขนาดเล็กกว่าชั้นกลาง เป็นรูปไข่ที่มีส่วนกว้างอยู่ด้านบน เกสรตัวผู้ชั้นนอกๆ เป็นหมัน โดยมีก้านชูที่เป็นเกสรตัวผู้ที่เป็นแผ่นบางๆ สีชมพูคล้ายกลีบในแต่มีขนาดเล็กกว่า ไม่มีอับเรณู แต่ปลายกลีบมีส่วนยื่นออกมาที่มีฐานเรียวเล็ก ส่วนปลายพองใหญ่ มีสีขาวนวล

4. บัวหลวงขาวซ้อน (บัวฉัตรขาว) มีชื่อว่า สัตตบุตย์ ดอกมีขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ทรงป้อม คล้ายบัวพันธุ์สัตตบงกช ดอกมีสีขาว ประกอบด้วยกลีบดอกสีเขียวอมขาว ส่วนกลีบชั้นในสีขาวตลอด ส่วนรูปทรงและการเรียงตัวของกลีบดอกคล้ายบัวพันธุ์สัตตบงกช

5.บัวหลวงพันธุ์ดอกสีชมพูเล็ก มีชื่อเรียกกันว่า บัวหลวงจีน บัวปักกิ่ง บัวเข็ม แหลมชมพูเล็ก มีลักษณะใบและดอกเช่นเดียวกับบัวพันธุ์ดอกสีชมพู แต่มีขนาด รูปร่างใบ และดอกเล็กกว่า ฝักมีขนาดเล็ก มีเมล็ดเพียง 4-5 เมล็ดเท่านั้น

ภาพที่ 1 ลักษณะของดอกบัวหลวง **A.** บัวแหลมชมพู-ปทุม **B.** บัวแหลมขาว-บุณฑริก
C1-2. บัวฉัตรชมพู-สัตตบงกช **D1-2.** บัวฉัตรขาว-สัตตบุตย์
E. บัวหลวงจีน *(Nelumbo nucifera* var. pekinese (China)
F. บัวหลวงอเมริกัน*(Nelumbo lutea* Pers.)

ที่มา: เศรษฐมันตร์, 2551.

3. การสกัดสารออกฤทธิ์จากพืช

การสกัดสารสำคัญในพืชสมุนไพรมีหลายวิธี ซึ่งวิธีการสกัดที่ดีที่สุดสำหรับพืชสมุนไพรแต่ละชนิดมักได้จากการทดลองขั้นต้น (วีณา, 2534) โดยทั่วไปวิธีการสกัดที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับปัจจัยหลาย ๆ อย่าง ได้แก่

1. คุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัด หากต้องการสกัดที่ไม่ใช้สาระสำคัญและคุณค่าทางการรักษาน้อย เช่น สารที่ใช้แต่งสี กลิ่น รส ของยาเตรียมต่าง ๆ ก็อาจใช้วิธีง่าย ๆ ที่ไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งหมดเปรียบเทียบกับราคาของสารสกัดที่เตรียมได้ว่าคุ้มค่ากับการลงทุนหรือไม่

2. ความต้องการที่จะให้ได้การสกัดที่สมบูรณ์ (Exhausted extraction) หรือเกือบสมบูรณ์ หากต้องการสารสกัดเจือจาง การใช้วิธีมาเซอเรชันก็เพียงพอแล้ว แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นก็ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

3. ธรรมชาติของพืชสมุนไพร

- ลักษณะและโครงสร้างของเนื้อเยื่อ สมุนไพรที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม เช่น ดอก ใบ อาจสกัดด้ววิธีมาเซอเรชัน หากเป็นพืชสมุนไพรที่มีเนื้อเยื่อที่แข็งแรงและเหนียว เช่น เปลือก ราก เนื้อไม้ ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง
- ความสามารถในการละลายของสาระสำคัญในน้ำยาสกัด ถ้าละลายได้นิยมใช้วิธีดูดซับ แต่ถ้าละลายได้น้อยก็จำเป็นต้องใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง
- ความสามารถในการละลายสาระสำคัญในน้ำยาสกัด ถ้าละลายได้ง่ายนิยมใช้วิธีตัวดูดซับ แต่ถ้าละลายได้น้อยก็จำเป็นต้องใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง
- ความคงตัวของสาระสำคัญในสมุนไพรต่อความร้อน ถ้าเป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อนควรใช้วิธีมาเซอเรชันหรือเพอร์โคเลชัน

4. ความต้องการที่จะให้ได้การสกัดที่สมบูรณ์ (Exhausted extraction) หรือเกือบสมบูรณ์ หากต้องการสารสกัดเจือจาง การใช้วิธีมาเซอเรชันก็เพียงพอแล้ว แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นก็ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

3.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นวิธีทำสารให้บริสุทธิ์ หรือเป็นวิธีแยกสารออกจากกัน โดยอาศัยสมบัติของการละลายของสารแต่ละชนิด (ตารางที่ 3) เนื่องจากสารต่างชนิดกันละลายในตัวทำละลายต่างชนิดกันได้ต่างกัน และสารชนิดเดียวกันละลายในตัวทำละลายต่างชนิดได้ต่างกัน

ตัวทำละลายที่เหมาะสม ควรจะมีสมบัติทั่วไปดังนี้ คือ ละลายได้ดีในสารที่ต้องการ ไม่ละลายสารอื่นในของผสมนั้น ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด มีจุดเดือดต่ำ ระเหยได้ง่าย เมื่อสกัดสารออกมาเป็นสารละลายแล้ว สามารถแยกตัวทำละลายออกจากสารละลายนั้นได้ง่าย ไม่เป็นพิษ หาง่าย และราคาถูก

ตารางที่ 1 แสดงชนิดตัวทำละลาย

ตัวทำละลาย	สูตรเคมี	จุดเดือด	Polarity	ความหนาแน่น
Non-Polar Solvents				
เฮกเซน	CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3	69 °C	2.0	0.655 g/ml
เบนเซน	C_6H_6	80 °C	2.3	0.879 g/ml
โทลูอีน	C_6H_5-CH_3	111 °C	2.4	0.867 g/ml
Diethyl ether	CH_3CH_2-O-CH_2-CH_3	35 °C	4.3	0.713 g/ml
คลอโรฟอร์ม	$CHCl_3$	61 °C	4.8	1.498 g/ml
Ethyl acetate	CH_3-C(=O)-O-CH_2-CH_3	77 °C	6.0	0.894 g/ml
Tetrahydrofuran (THF)	/-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-\	66 °C	7.5	0.886 g/ml
Methylene chloride	CH_2Cl_2	40 °C	9.1	1.326 g/ml
Polar Aprotic Solvents				
Acetone	CH_3-C(=O)-CH_3	56 °C	21	0.786 g/ml
Acetonitrile (MeCN)	CH_3-C≡N	82 °C	37	0.786 g/ml
Dimethylformamide (DMF)	H-C(=O)N$(CH_3)_2$	153 °C	38	0.944 g/ml
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	CH_3-S(=O)-CH_3	189 °C	47	1.092 g/ml
Polar Protic Solvents				
Acetic acid	CH_3-C(=O)OH	118 °C	6.2	1.049 g/ml
n-Butanol	CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-OH	118 °C	18	0.810 g/ml
Isopropanol	CH_3-CH(-OH)-CH_3	82 °C	18	0.785 g/ml

n-Propanol	CH_3-CH_2-CH_2-OH	97 °C	20	0.803 g/ml
เอทานอล	CH_3-CH_2-OH	79 °C	24	0.789 g/ml
เมทานอล	CH_3-OH	65 °C	33	0.791 g/ml
กรดฟอร์มิก	H-C(=O)OH	100 °C	58	1.21 g/ml
น้ำ	H-O-H	100 °C	80	0.998 g/ml

3.2 การเตรียมตัวอย่างพืช

การเตรียมตัวอย่างพืชต้องคำนึงถึงสารสำคัญในพืชคือการตรวจเอกลักษณ์ของพืชที่ถูกต้อง ไม่มีพืชอื่นเจือปนไม่มีโรคพืช อายุพืชที่ผลิตสารสำคัญ และการเก็บรักษา การเตรียมตัวอย่างให้แห้งเพื่อคงคุณภาพของสมุนไพรไว้ ควรจะทำให้แห้งโดยวิธีที่เร็วและอุณหภูมิต่ำๆ เพราะอุณหภูมิสูงจะทำให้สารสำคัญสลายหรือเปลี่ยนแปลง (วันดี, 2536)

3.3 ขั้นตอนการสกัด ตัวอย่างวิธีการสกัดอย่างเป็นขั้นตอน ทำได้หลายวิธี คือ

1. การสกัดโดยเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย โดยสกัดด้วยแอลกอฮอล์หรือเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากแอลกอฮอล์นี้ไปทำให้เข้มข้นก่อนที่จะนำมาพาร์ทิชัน (Partition) กับตัวทำละลายที่มีขั้วต่าง ๆ กันโดยเริ่มจากตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (non-polar solvent) ไปถึงตัวทำละลายมีขั้ว (polar solvent) เช่น เฮกเซน อทิลแอซีเทต (ethyl acetate) บิวทานอล (butanol) เป็นต้น

2. การสกัดโดยอาศัยคุณสมบัติในการเป็นกรดและด่างของสาร โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม จากนั้นจึงแยกกลุ่ม โดยพาร์ทิชันกับกรดและด่าง หรือทางกลับกันพาร์ทิชันกับกรดและด่างก่อน แล้วจึงสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

3.4 การทำสารสกัดให้เข้มข้น (Concentration)

เนื่องจากสารสกัดอย่างหยาบที่ได้จากวิธีการสกัดข้างต้นจะมีปริมาตรมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

1. การกลั่นในภาวะสูญญากาศ (Distillation in vacuum) จัดเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดโดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ พร้อมทั้งลดความดันลงให้เกือบเป็นสูญญากาศ โดยใช้ปั๊มสูญญากาศ (vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า โรตารีอีวาโพเรเตอร์ (rotary evaporator) ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ 3 ส่วน คือ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบที่กลั่น (distillation flask) ส่วนคอนเดนเซอร์หรือส่วนควบแน่นไอสารละลาย (condenser) และภาชนะรองรับสารละลายหลังกลั่น (receiving flask) โดยสารสกัดอย่างหยาบซึ่งบรรจุในภาชนะจะแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำที่ควบคุมอุณอุณหภูมิได้และจะหมุน (rotate) ตลอดเวลาที่ทำงาน เพื่อให้มีการกระจาย

ความร้อนอย่างถั่วถึงและสม่ำเสมอ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบนี้ต่อเข้ากับส่วนควบแน่น ซึ่งมีระบบทำความเย็นหล่ออยู่ตลอดเวลา ปลายของส่วนควบแน่นจะมีภาชนะรองรับ โดยทั้งระบบจะต่อเข้ากับระบบสูญญากาศสารละลายที่ระเหยออกจากภาชนะบรรจุจะควบแน่น ที่บริเวณคอนเดนเซอร์และหยดลงมาในภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่นซึ่งสารละลายดังกล่าวสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และนำกลับใช้ได้

2. การระเหย (free evaporation) เป็นการนำตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัด โดยใช้ความร้อนจากหม้อไอน้ำ (water bath) หรือแผ่นความร้อน (hot plate) วิธีนี้อาจทำให้องค์ประกอบในสารสกัดสลายตัวได้เนื่องจากอุณหภูมิสูงเกินไป และหากใช้สารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในสารสกัด การระเหยโดยให้ความร้อนโดยตรง (direct heat) บนแผ่นความร้อน อาจเกิดอันตรายได้ง่าย นอกจากนี้ควรคำนึงถึงอุณหภูมิที่จะทำให้เกิดการสลายตัวของสารสำคัญ เมื่อใช้ความร้อน

3. การทำให้แห้ง (Drying) เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดจนแห้งได้สารสกัดออกมาในสภาพของแข็งหรือกึ่งของแข็ง มีหลายวิธี เช่น การใช้ความเย็น (lyophillizer หรือ freeze dryer) หรือ การใช้ความร้อน (spray dryer) ฯลฯ

4. อัลตราฟิลเทรชัน (Ultrafiltration) เป็นการทำสารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้แผ่นเมมเบรม (membrane) ใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) สูงกว่า 5,000

โดยทั่วไปแล้ว การสกัดเพื่อทำเป็นสารสกัดของพืชนั้นอาจทำได้ทั้งพืชที่แห้งแล้วหรือยังสดอยู่ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับประเภทของสารที่มีอยู่ในสารสกัดของพืชนั้นๆ สำหรับสารที่มีความเป็นขั้ว (polarity) น้อย เมื่อเทียบกับสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยทั่วไป แล้ว และเป็นสารที่มักจะสกัดออกมาด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (non-polar sovent) เฮกเซน (hexane) หรือปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) มักจะสกัดจากพืชที่ทำให้แห้งแล้วหรือที่ยังสดอยู่ก็ได้ แล้วแต่ละกรณีและยังขึ้นอยู่กับสารที่มีอยู่ในสารสกัดที่มีอยู่มีเสถียรภาพมากน้อยเพียงใด สารบางชนิดเมื่อทำให้แห้ง ไม่ว่าจะโดยการใช้ความร้อนหรือโดยการตากแดดหรือแม้แต่ตากให้แห้งในร่ม ก็สามารถเกิดความเสื่อมสลาย (decomposition) ได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องรีบนำมาสกัดขณะที่พืชยังสดอยู่ ในการสกัดนั้น ถ้าใช้วิธีการสกัดเย็น(cold extraction) คือแช่ด้วยตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง หรือโดยการสกัดร้อน(hot extraction) คือใช้ Soxhlet extraction apparatus หรือโดยการต้มกับพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม สำหรับวิธีการใดจะเหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารที่มีอยู่ เช่น หากสารนั้นสกัดออกมาได้ง่ายโดยตัวทำละลายชนิดหนึ่งหรือไม่เสถียรต่อความร้อน จะเลือกใช้วิธีการสกัดเย็น เพราะเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกและทำให้สารเกิดการเสื่อมสลายน้อย

3.5 การแยกส่วนผสม (Separation)

ในการแยกสารสกัดเบื้องต้น ซึ่งเป็นส่วนผสมของสารเคมีเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ นั้น ต้องอาศัยวิธีการแยกโดยใช้เทคนิคคือ

1. Thin Layer Chromatography

เป็นการแยกของผสมโดยใช้ Stationary phase คือ ซิลิกาเจลเคลือบบนแผ่นอลูมิเนียม (แผ่น TLC) เมื่อหยดสารสกัดลงบน Stationary phase แล้วจึงนำแผ่น TLC ที่ได้ไปใส่ในแทงค์ ซึ่งบรรจุ Mobile phase ที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดกระบวนการเคลื่อนที่ของสารสกัดบน Stationary phase เพื่อให้สารสกัดผสมแยกออกจากกัน

2. Column Chromatography

เป็นวิธีการแยกสารสกัด โดยให้สารเคลื่อนที่ไปบน Stationary phase คือซิลิกาเจลซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดแก้วกลวง ตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็น Mobile phase แล้วสารจะเคลื่อนที่ผ่าน Stationary phase เพื่อแยกสารสกัดที่ผสมออกจากกัน

3.6 การตรวจสอบเอกลักษณ์ (Identification)

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของสาร เป็นการวิเคราะห์ สารสกัดที่มีแบนด์สารแยกออกมา จากส่วนผสมในสารสกัด โดยการใช้เทคนิคทางสเปกโทรเมตรีต่างๆ ได้แก่ สเปกโทรเมตรีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nucler magnetic Resonance Spectrometry, NMR) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการดูดกลืนพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้า โดยในสเปกโทรเมตรีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์นิวเคลียสที่ถูกวางอยู่ในสนามแม่เหล็กที่มีความแรงค่าหนึ่งๆ จะสามารถดูดกลืนพลังงานแม่เหล็ก ในช่วงความถี่คลื่นวิทยุ ที่เหมาะสมแล้วเปลี่ยนระดับ พลังงานขึ้นไปสู่ระดับพลังที่สูงขึ้น หากนิวเคลียส ที่ศึกษาเป็นนิวเคลียสของอะตอมของไฮโดรเจนหรือโปรตอน เรียกว่า สเปกโทรเมตรีนิวเคลียร์แมกเนติกของโปรตอน (Proton-NMR, ^{1}H- NMR) ข้อมูลทางด้านนิวเคลียร์แมกเนติกเรแนนซ์ นี้ เมื่อใช้ประกอบกับข้อมูลที่ได้จากสเปกโทรเมตรีอัลตราไวโอเลต สเปกโทรเมตรีอินฟราเรด และสเปกโทรเมตรีชนิดมวล(Mass spectrometry, MS) จะเป็นประโยชน์ในการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของอินทรีย์ (อรอุมา, 2547)

4. Column Chromatography (CC)

ทำได้โดยการบรรจุสารที่เป็นเฟสอยู่กับที่ เช่น อลูมินาหรือซิลิกาเจลไว้ในคอลัมน์ แล้วเทสารผสมที่เป็นสารละลายของเหลว ลงสู่คอลัมน์ สารผสมจะผ่านคอลัมน์ช้าๆ โดยตัวทำละลายซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่เป็นผู้พาไป สารในเฟสอยู่กับที่จะดูดซับสารในสารผสมไว้ส่วนประกอบใดของสารผสมที่ถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ช้า ส่วนที่ถูกดูดซับไม่ดีจะเคลื่อนที่ได้เร็ว ทำให้สารผสมแยกจากกันได้

การเลือกตัวทำละลายและตัวดูดซับ

1. ตัวทำละลายและสารที่ต้องการแยกจะต้องมีการละลายไม่เท่ากัน
2. ควรเลือกตัวดูดซับที่มีการดูดซับสารได้ไม่เท่ากัน
3. ถ้าต้องการแยกสารที่ผสมกันหลายชนิด อาจต้องใช้ตัวทำละลายหลายชนิดหรือใช้ตัวทำละลายผสม

4. ตัวทำละลายที่นิยมใช้ ได้แก่ เฮกเซน ไซโคลเฮกเซน เบนซีน อะซีโตน คลอโรฟอร์ม เอธานอล

5. ตัวดูดซับที่นิยมใช้ ได้แก่ อะลูมินาเจล (Al_2O_3) ซิลิกาเจล (SiO_2)

5. Thin Layer Chromatography (TLC)

เป็นโครมาโทกราฟีแบบระนาบ (plane chromatography) โดยทำเฟสอยู่กับที่ให้มีลักษณะเป็นครีมข้น แล้วเคลือบบนแผ่นกระจกให้ความหนาของการเคลือบเท่ากันตลอดแล้วนำไปอบให้แห้ง หยดสารละลายของสารผสมที่ต้องการแยกบนแผ่นที่เคลือบเฟสอยู่กับที่นี้ไว้ แล้วนำไปจุ่มในภาชนะที่บรรจุตัวทำละลายที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ไว้ โดยให้ระดับของตัวทำละลายต้องอยู่ต่ำกว่าระดับของจุดที่หยดสารผสมไว้ ตัวทำละลายจะซึมไปตามเฟสอยู่กับที่ด้วยการซึมตามรูเล็กเหมือนกับน้ำที่ซึมไปในกระดาษหรือผ้า เมื่อซึมถึงจุดที่หยดสารผสมไว้ ตัวทำละลายจะชะเอาองค์ประกอบในสารผสมนั้นไปด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพมีขั้ว (polarity) ของสารที่เป็นองค์ประกอบกับสารที่เป็นตัวทำละลาย ถ้าตัวทำละลายเป็นโมเลกุลมีขั้ว (polar molecules) จะชะเอาสารในสารผสมที่เป็นสารมีขั้วไปด้วยได้เร็ว ส่วนสารที่ไม่มีขั้วในสารผสมจะถูกชะพาไปได้ช้า สารผสมก็จะแยกออกจากกัน

ค่า Rf

โครมาโทกราฟีแบบกระดาษสามารถนำมาคำนวณหาค่า Rf ได้ ค่า Rf (Rate of flow) เป็นค่าเฉพาะตัวของสาร ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายและตัวดูดซับ ดังนั้นการบอกค่า Rf ของสารแต่ละชนิดจึงต้องบอกชนิดของตัวทำละลาย และตัวดูดซับเสมอค่า Rf สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคมีเคลื่อนที่ (cm)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (cm)}}$$

สารต่างชนิดกันจะมีค่า Rf แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถนำค่า Rf มาใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของสารได้ กล่าวคือ ถ้าสารใดมีความสามารถในการละลายสูงจะมีค่า Rf มาก เนื่องจากตัวทำละลายจะเคลื่อนที่เร็วกว่าสารที่จะแยก ค่า Rf มีค่าน้อยกว่า 1 เสมอ

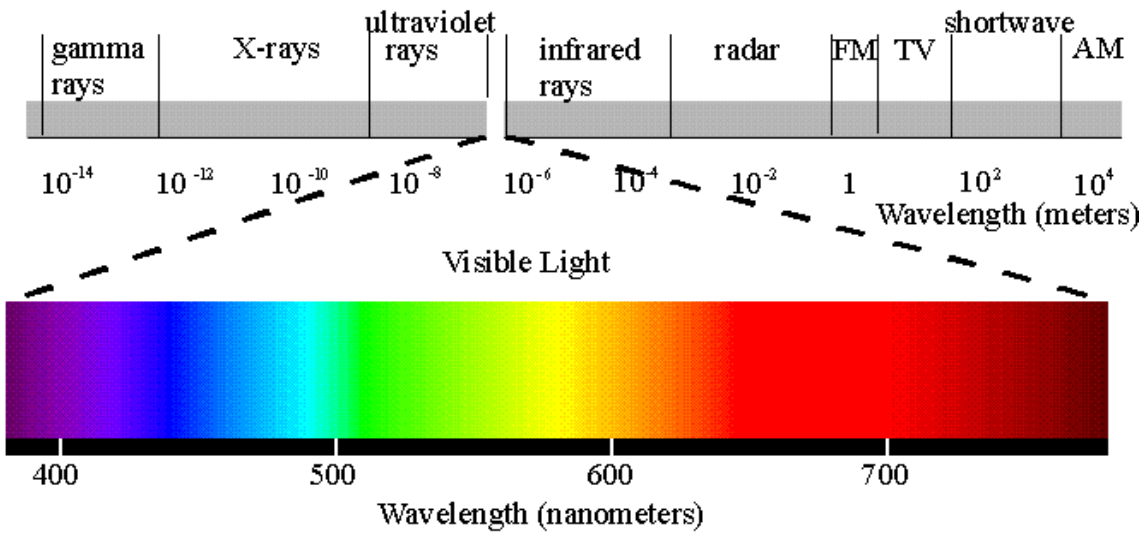
ถ้าใช้ตัวทำละลายและตัวดูดซับชนิดเดียวกันปรากฏว่ามีค่า Rf เท่ากัน อาจสันนิษฐานได้ว่า สารดังกล่าวเป็นสารชนิดเดียวกัน หรือนำสารตัวอย่างมาทำโครมาโทกราฟีคู่กับสารจริงก็ได้

6. อัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโตรสโกปี (Ultraviolet and Visible Spectroscopy)

ใช้ในการตรวจหาชนิดและปริมาณของสาร โดยใช้หลักการที่สารแต่ละชนิดจะสามารถดูดกลืนรังสีได้ในช่วงความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน และปริมาณการดูดกลืนรังสีขึ้นอยู่กับความ

เข้มข้นของสารนั้น UV-Vis spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อน และสารอนินทรีย์ ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้ เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ในปัจจุบันได้รับการพัฒนาให้มีขนาดที่เล็กลง มีความไวมากขึ้น ให้ผลลัพธ์ที่ถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น รวมไปถึงการพัฒนาโปรแกรมที่ใช้ควบคู่กันกับเครื่องมือในการวิเคราะห์ และการพ่วงต่อด้วยเทคนิคอื่นๆ ทำให้สามารถนำไปใช้งานได้กว้างขึ้น

คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้ามีแถบสเปคตรัม ตั้งแต่ช่วงความยาวคลื่นสั้น (รวมทั้งรังสีแกมมาและรังสีเอ็กซ์) ไปจนถึงช่วงความยาวคลื่นยาว (รวมถึงไมโครเวฟ และคลื่นวิทยุ) รังสียูวีและแสงขาวเป็นเพียงส่วนเล็กๆ ส่วนหนึ่งของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า โดยมีความยาวคลื่นประมาณ 190-800 นาโนเมตร



ภาพที่ 2 คลื่นแสงในช่วง UV-Visible

6.1 สาเหตุการดูดกลืนแสงในช่วงยูวี-วิสิเบิล

เมื่อแสงที่เข้าไปอยู่ในช่วงยูวี-วิสิเบิล ผ่านเข้าไปในโมเลกุลของสาร สารนั้นจะดูดกลืนแสงเฉพาะบางช่วง ทำให้เกิดมีการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของอิเล็กตรอน ซึ่งโดยมากจะใช้พลังงานประมาณ 30-150 kcal/mol และอิเล็กตรอนที่อยู่วงนอกสุด หรืออิเล็กตรอนที่เกิดพันธะแล้ว หรืออิเล็กตรอนที่ยังไม่เกิดพันธะ ซึ่งแต่ละชนิดแตกต่างกัน อิเล็กตรอนที่ได้รับพลังงานสูงสุดขึ้นนี้เรียกว่า antibonding orbital

6.2 ส่วนประกอบของเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

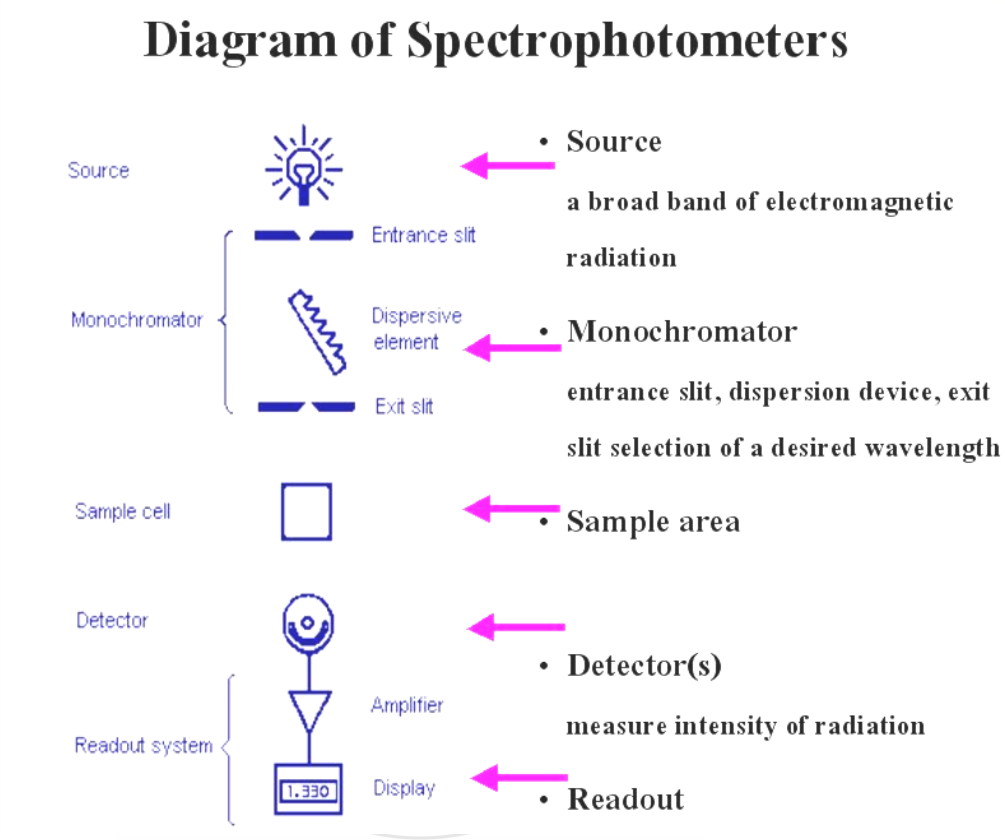
1.แหล่งกำเนิดรังสี: deuterium lamp & tungsten lamp

2.Monochromator: แยกคลื่นรังสีให้เหลือเป็นความยาว คลื่นเดียว

3.เซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายตัวอย่าง

4.Detector: วัดความเข้มของรังสีที่ถูกดูดกลืน โดยการแปลงพลังงานคลื่นรังสีเป็นพลังงานไฟฟ้า

5.เครื่องแสดงค่า: เปลี่ยนสัญญาณที่มาจาก detector เป็นค่าที่ใช้งาน



ภาพที่ 3 ส่วนประกอบของเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

7. การตรวจสอบสารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening)

7.1 กลุ่มของสารสำคัญที่พบในพืช

สารสำคัญในพืชมีหลายชนิดซึ่งอาจแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 7 กลุ่ม ดังนี้ คือ (http://ittm.dtam.moph.go.th/data_all/herbs_index.html)

1. คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates) เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจน คาร์โบไฮเดรตเป็นสารกลุ่มที่พบมากทั้งในพืช และสัตว์ สารที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เช่น แป้ง น้ำตาล กัม (Kum) วุ้น (Agar) น้ำผึ้ง เปคติน (Pectin) เป็นต้น

2. ไขมัน (Lipids) เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำแต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic Solvent) เมื่อทำปฏิกิริยากับด่างจะกลายเป็นสบู่ น้ำมันในพืชหลายชนิดเป็นยาสมุนไพร เช่น น้ำมันละหุ่ง น้ำมันมะพร้าว เป็นต้น

3. น้ำมันหอมระเหย (Volatile oil หรือ Essential oil) เป็นสารที่พบมากในพืชเขตร้อนเป็นน้ำมันมีกลิ่นและรสเฉพาะตัว ระเหยได้ง่ายในอุณหภูมิธรรมดา เบากว่าน้ำ สามารถสกัดออกมาจากส่วนของพืชได้โดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ (stream distillation) หรือการบีบ (expression) ประโยชน์คือเป็นตัวแต่งกลิ่นในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ และสมุนไพร มีประโยชน์ด้านขับลม ฆ่าเชื้อโรค พืชสมุนไพรที่มีน้ำมันหอมระเหย คือ กระเทียม ขิง ไพล มะกรูด ตะไคร้ กานพลู อบเชย เป็นต้น

4. เรซินและบาลซัม (Resins and Balsums) เรซินเป็นสารอินทรีย์หรือสารผสมประเภทโพลีเมอร์ มีรูปร่างไม่แน่นอน ส่วนใหญ่จะเปราะแตกง่าย บางชนิดจะนิ่มไม่ละลายน้ำ ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เมื่อเผาไฟจะหลอมเหลวได้สารที่ใส ข้น และเหนียว เช่น ชันสน เป็นต้น บาลซัมเป็นสาร resinous mixture ซึ่งประกอบด้วยกรดซินนามิก (CIN-NAMIC ACID) หรือเอสเตอร์ของกรดสองชนิดนี้ เช่น กำยาน เป็นต้น

5. แอลคาลอยด์ (Alkaloids) เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ (Organic Nitrogen Compound) มักพบในพืชชั้นสูงมีสูตรโครงสร้างซับซ้อนและแตกต่างกันมากมาย ปัจจุบันพบแอลคาลอยด์มากกว่า 5,000 ชนิด คุณสมบัติของแอลคาลอยด์คือ ส่วนใหญ่มีรสขม ไม่ละลายน้ำ ละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ (Organic Solvent) มีฤทธิ์เป็นด่าง แอลคาลอยด์มีประโยชน์ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด ยาชาเฉพาะที่ ยาแก้ไอ ยาแก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะและลำไส้ ยาลดความดัน ยาควบคุมการเต้นของหัวใจ เป็นต้น พืชสมุนไพรที่มีแอลคาลอยด์เป็นส่วนมาก คือ หมาก ลำโพง ซิงโคนา ดองดึง ระย่อม ยาสูบ กลอย ฝิ่น แสลงใจ เป็นต้น

6. กลัยโคไซด์ (Glycosides) เป็นสารประกอบอินทรีย์ ที่เกิดจาก aglycone (หรือ genin) จับกับส่วนที่เป็นน้ำตาล (glycone part) ละลายน้ำได้ดี โครงสร้างของ aglycone มีความแตกต่างกันหลายแบบทำให้ประเภทและสรรพคุณทางเภสัชวิทยาของกลัยโคไซด์มีหลายชนิดใช้เป็นยาที่มี

ประโยชน์ และสารพิษที่มีโทษต่อร่างกาย กลัยโคไซด์จำแนกตามสูตรโครงสร้างของ aglycone ได้หลายประเภท คือ

คาร์ดิเอ็ก กลัยโคไซด์ (Cardiac Glycosides) มีฤทธิ์ต่อระบบกล้ามเนื้อหัวใจ และระบบการไหลเวียนของโลหิต เช่น ใบยี่โถ เป็นต้น

แอนทราควิโนน กลัยโคไซด์ (Anthraquinone Glycosides) มีฤทธิ์เป็นยาระบาย ยาฆ่าเชื้อ และสีย้อมผ้า เช่น ใบมะขามแขก ใบขี้เหล็ก ใบชุมเห็ดเทศ ใบว่านหางจระเข้

ซาโปนิน กลัยโคไซด์ (Saponins Glycosides) เป็นกลุ่มสารที่มีคุณสมบัติเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำ เช่น ลูกประคำดีควาย เป็นต้น

ไซยาโนเจนนีติก กลัยโคไซด์ (Cyanogenetic Glycosides) มีส่วนของ aglycone เช่น Cyanogenetic Nitrate สารกลุ่มนี้เมื่อถูกย่อยจะได้สารพวกไซยาไนด์ เช่น รากมันสำปะหลัง ผักสะตอ ผักหนาน ผักเสี้ยนผี กระเบาน้ำ เป็นต้น

ไอโซไทโอไซยาเนทกลัยโคไซด์ (Isothiocyanate Glycosides) มีส่วนของ aglycone เป็นสารจำพวก Isothiocyanate

ฟลาโวนอยด์ กลัยโคไซด์ (Flavonol Glycosides) เป็นสารที่พบในหลายส่วนของพืช ส่วนใหญ่สีออกไปทางสีแดง เหลือง ม่วงน้ำเงิน เช่น ดอกอัญชัน เป็นต้น

ฟลาโวนอยด์ กลัยโคไซด์ (Flavonol Glycosides) เป็นสารที่พบในหลายส่วนของพืช ส่วนใหญ่สีออกไปทางสีแดง เหลือง ม่วงน้ำเงิน เช่น ดอกอัญชัน เป็นต้น

แอลกอฮอลิค กลัยโคไซด์ (Alcoholic Glycosides) มี aglycone เป็นแอลกอฮอล์ ยังมีกลัยโคไซด์อีกหลายชนิด เช่น ฟีนอลิคกลัยโคไซด์ (Phenolic Glycosides) แอลดีไฮด์ กลัยโคไซด์ (Aldehyde Glycosides) เป็นต้น

7. แทนนิน (Tannins) เป็นสารที่พบได้ในพืชหลายชนิด มีโมเลกุลใหญ่และโครงสร้างซับซ้อน มีสถานะเป็นกรดอ่อน รสฝาด แทนนินใช้เป็นยาฝาดสมานและยาแก้ท้องเสีย ช่วยรักษาแผลไฟไหม้ และใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง กรณีที่รับประทานแทนนินเป็นประจำ อาจทำให้เกิดมะเร็งได้ สมุนไพรที่มีแทนนิน คือ เปลือกทับทิม เปลือกอบเชย ใบฝรั่ง ใบ/เปลือกสีเสียด ใบชา เป็นต้น

นอกจากสารดังกล่าวในพืชสมุนไพรยังมีสารประกอบอีกหลายชนิด เช่น ไขมันสเตียรอยด์ (Steroid) เป็นต้น สารเหล่านี้บางชนิดมีสรรพคุณทางยาเช่นกัน

7.2 การตรวจสอบทางพฤกษเคมี

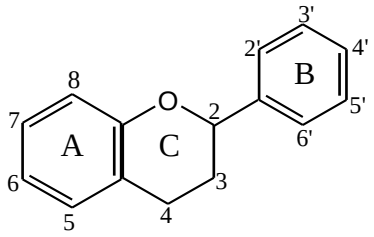
การตรวจสอบทางพฤกษเคมี (Phytochemical screening) เป็นการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากพืชในระยะเวลาอันสั้น ง่าย รวดเร็ว และใช้เครื่องมือน้อยที่สุด โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมีง่ายๆ ใช้ปฏิกิริยาการเกิดสี (color reaction) ซึ่งจะให้ผลเป็นสีต่างๆ หรือการเกิด

ตะกอน บอกถึงกลุ่มสารเคมีที่สำคัญและมีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ในการศึกษาควรเริ่มโดยการตรวจเอกสารแล้วนำพืชที่เราสนใจมาตรวจสอบเบื้องต้นว่ามีสารสำคัญประเภทใด โดยอาศัยข้อมูลเบื้องต้นที่ว่ามีสารเคมีกลุ่มใดบ้างที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

อ้อมบุญ (2536) ได้อธิบายกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ดังนี้ "**แอลคาลอยด์** (alkaloids) เป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างและประกอบด้วยไนโตรเจนอย่างน้อย 1 อะตอม ที่พบในพืชและสัตว์ ส่วนใหญ่เกิดจากชีวสังเคราะห์จากกรดอะมิโน พบมากในพืชดอก และพบในพืชใบเลี้ยงคู่มากกว่าใบเลี้ยงเดี่ยว เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญมากทางด้านเภสัชวิทยา **แทนนิน** (tannins) เป็นสารจำพวก polyphenol ที่มีความสลับซับซ้อนมากและมีอยู่แพร่หลายในอาณาจักรพืชเกือบจะทุกวงศ์ของพืชมีแทนนิน ป้องกันพืชให้พ้นจากการทำลายโดยแมลงและรา เพราะแทนนินมีฤทธิ์ antiseptic และเมื่อพืชผ่านระยะหนึ่งไปแล้ว แทนนินจะถูกทำลายไป หรือถูกนำไปสะสมในเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว ดังนั้นจึงมีความคิดว่าแทนนินเป็นของเสียที่ได้จากการดำรงชีวิตของพืช จึงถูกนำไปสะสมในใบ ผล เปลือกหรือลำต้น **ฟลาโวนอยด์** (flavonoids) เป็นสารกลุ่มที่พบมากในพืชทั้งในรูปของ aglycone และไกลโคไซด์ ซึ่งไกลโคไซด์มักพบมากในดอก ผล และใบ ส่วนใหญ่เป็นสารสี (pigment) สำหรับการล่อแมลงและสัตว์เพื่อการผสมเกสร และการกระจายเมล็ดของดอกและผล ฟลาโวนอยด์บางชนิดช่วยควบคุมการเจริญเติบโตของพืช บางชนิดเป็นสารต่อต้านเชื้อราและแบคทีเรีย บางชนิดสามารถป้องกันพืชจากแมลง และสัตว์อื่นได้ และหลายชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ช่วยเพิ่มความต้านทานของหลอดเลือดฝอย และจากสารสกัดจากใบแป๊ะก้วย ซึ่งเพิ่มการไหลเวียนของโลหิตไปสมอง **สเตอรอยด์** (steroids) ทำหน้าที่หลายอย่าง หน้าที่ที่สำคัญอย่างหนึ่ง คือเป็นฮอร์โมน **คาร์ดิแอคไกลโคไซด์** (cardiac glycosides) เป็นสารเคมีที่ออกฤทธิ์ต่อหัวใจ **แอนทราควิโนน** (anthraquinones) เป็นสารกลุ่มที่ออกฤทธิ์เป็นยาระบาย พบได้ทั้งในพืช แมลง และจุลชีพ ในพืชชั้นสูง พบได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงคู่และพืชใบเลี้ยงเดียว ส่วนใหญ่ใช้ประโยชน์เป็นยาถ่าย ยาระบาย ใช้เป็นยารักษาเชื้อราที่ผิวหนัง และใช้เป็นสีย้อม

กลุ่มสาร ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

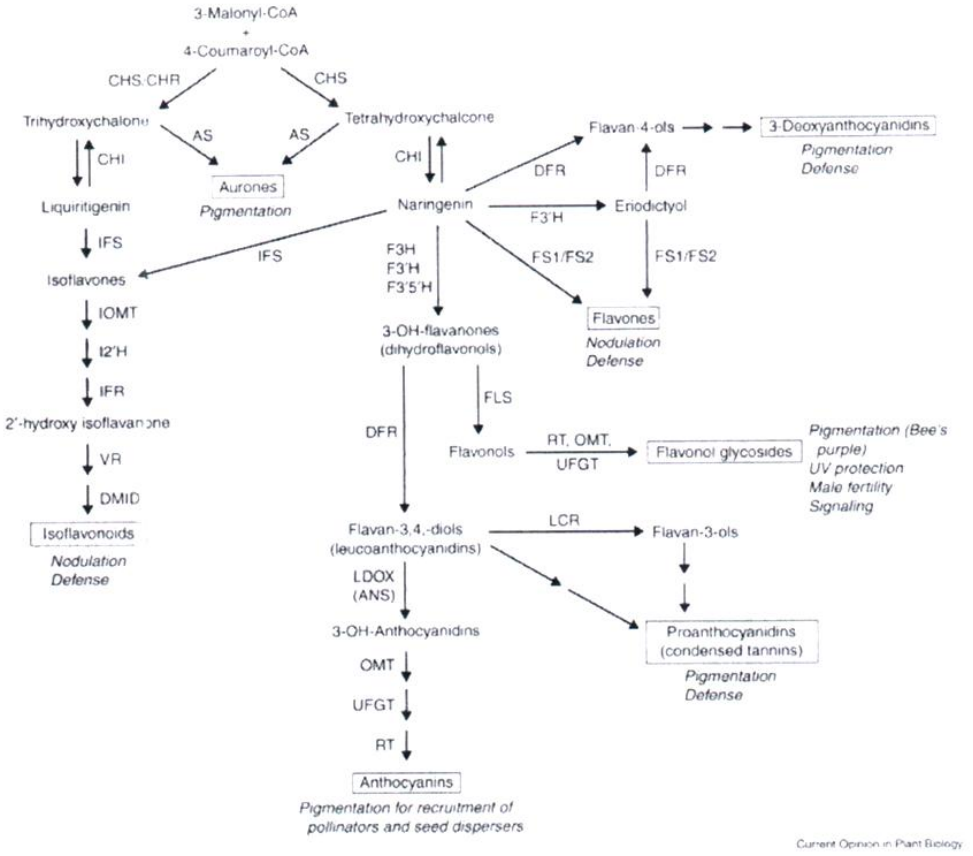
สารฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ทั่วไปในพืชที่มีสีเขียว และพบในทุกส่วนของพืช ไม่ว่าจะเป็นใบ ราก เนื้อไม้ เปลือกไม้ ดอก ผล หรือเมล็ด ในสัตว์พบบ้าง โดยมีความเชื่อว่ามาจากพืชที่บริโภคเข้าไปมากกว่าการเกิดชีวะสังเคราะห์ในร่างกายของสัตว์เอง ฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารสำคัญของกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenol) มีสูตรโครงสร้างหลักเป็นฟลาแวน (flavan) ดังแสดงในภาพที่ 4 หรือ 2-phenylbenzopyran ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม ที่มีสูตรโครงสร้างพื้นฐานเป็น C_6-C_3 –C_3 คือ ประกอบด้วยคาร์บอน 3 อะตอม และมีความแตกต่างต่างกันตรง oxidation state ของ aliphatic chain ของอะตอมคาร์บอน 3 อะตอมนี้



ภาพที่ 4 โครงสร้างของ Flavan

การชีวสังเคราะห์กลุ่มสาร ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์มีสูตรโครงสร้างหลักเป็น C_6-C_3 –C_3 ซึ่งเกิดจาก phenyl-propanoid (C_6-C_3 – C_3) เชื่อมกับ malonyl-CoA 3 หน่วย ซึ่งมีวิถีการชีวสังเคราะห์ ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 การชีวสังเคราะห์กลุ่มสารฟลาโวนอยด์

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยากลุ่มสารฟลาโวนอยด์

สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ นอกจากจะเป็นสารที่ทำให้ดอก หรือผลไม้มีสีสวย เช่น สีเหลือง แดง ฟ้า หรือ ม่วงน้ำเงิน ซึ่งมีประโยชน์ ใช้ในการล่อแมลง นก หรือผึ้งเข้ามาผสมเกสร เพื่อในการแพร่กระจายพันธุ์แล้ว มีรายงานการศึกษามากมาย ยืนยันถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของฟลาโว

นอยด์ที่ใช้ป้องกันในการรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด ฤทธิ์ต้านมะเร็ง การต้านแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ ต้านการอักเสบ ต้านการแพ้ เป็นต้น ซึ่งพบว่าคุณสมบัติเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารฟลาโวนอยด์

สำหรับกลไกการต้านอนุมูลอิสระของกลุ่มสารฟลาโวนอยด์นั้น ได้มีรายงานการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยมีกลไกหลักในการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มนี้ รวมทั้งโพลีฟีนอลอื่นๆ มี 3 กลไก คือ

1. เป็นสารคีเลต (chelating) โดยเฉพาะสารโพลีฟีนอลที่มีโครงสร้างเป็นออร์โทไดไฮดรอกซีฟีนอลิก (ortho-dihydroxyphenolic) ทำหน้าจับหรือสร้างพันธะโคออร์ดิเนตกับโลหะหนัก เช่น ทองแดง และเหล็ก มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระ รวมทั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ

2. เป็นสารต้านออกซิเดชันโดยการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain breaking antioxidant) ในการยับยั้งหรือขจัดอนุมูลอิสระ เช่น lipid alkoxyl และ peroxyl radical เป็นต้น โดยทำหน้าที่ เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลเหล่านั้น ดังแสดงในปฏิกิริยา (1) หลังจากที่ฟลาโวนอยด์ถูกออกซิไดซ์แล้วจะได้อนุมูลของฟลาโวนอยด์ฟีนอกซิลเป็นผลิตผล และอนุมูลที่ได้นี้มีความเสถียรมากกว่า เนื่องจากโครงสร้างของฟลาโวนอยด์มีการ delocalize ของอิเล็กตรอนตลอดเวลา

$$\text{Flavonoid-OH} + \dot{R} \longrightarrow \text{Flavonoid-}\dot{O} + RH \qquad (1)$$

โดยที่ Flavonoid-OH = สารฟลาโวนอยด์

$\dot{R}$ = อนุมูลอิสระในร่างกาย

Flavonoid-$\dot{O}$ = อนุมูลฟีนอกซิล

3. ทำหน้าที่ regenerate วิตามินอี (α-tocopherol) โดยจะรีดิวซ์อนุมูล α-tocopheroxyl กลับเป็น α-tocopherol เหมือนเดิม ทำให้สามารถทำหน้าที่เป็น antioxidant ได้ต่อไป ดังแสดงในสมการ

$$\alpha\text{-tocopheryl-OH} + \dot{R} \longrightarrow \alpha\text{-tocopheryl - O}^{\bullet} + RH$$

$$\alpha\text{-tocopheryl - O}^{\bullet} + \text{Flavonoid-OH} \longrightarrow \alpha\text{-tocopheryl-OH} + \text{Flavonoid-}\dot{O}$$

มีการรายงานการศึกษาว่า ฟลาโวนอยด์เฉพาะกลุ่มฟลาโวน (flavones) และไอโซฟลาโวน (isoflavone) สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้ โดยยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) ผ่าน PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor-γ) ซึ่งเป็นแฟกเตอร์ที่มีหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2 โดยพบว่าโครงสร้างที่จำเป็นในการยับยั้ง ได้แก่ (1) พันธะคู่ที่ C2-

C3 ของวง C (2) หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 5 และ 7 ที่วง A และหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 4’ บนวง A และยังมีรายงานการศึกษายืนยันว่า ฟลาโวนอยด์สามารถยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ COX ของยีนส์ โดยเกิดอัตรกิริยาในกระบวนการ cell signaling เช่น NF-kB, protein kinase C และ tyrosine kinase เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงฤทธิ์อื่นๆ เช่น สารกลุ่มไอโซฟลาโวนสามารถออกฤทธิ์เป็น phytoestrogen โดยจับกับเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ (β-subtype) ทำให้สามารถใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนในผู้หญิงที่ใกล้หมดประจำเดือน รวมทั้งใช้ป้องกันมะเร็งที่มีความสัมพันธ์กับฮอร์โมน เช่น มะเร็งเต้านม และมะเร็งต่อมลูกหมาก เป็นต้น

โครงสร้างที่สำคัญพื้นฐานที่จำเป็นต่อการออกฤทธิ์ที่ต้านอนุมูลอิสระ

1. โครงสร้าง catechol หรือ ortho-diphenolic group ในวง B ถือเป็นโครงสร้างที่สำคัญที่สุดสำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งนอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยทำหน้าที่เป็น hydrogen donating แล้ว ยังสามารถจับหรือคีเลตกับโลหะหนักโดยเฉพาะ ทองแดง และเหล็ก ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสร้าง และการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระในร่างกาย
2. พันธะคู่ที่ตำแหน่ง 2-3 คอนจูเกต (conjugate) กับหมู่ 4-oxo ในวง C ซึ่งจะเพิ่มความเสถียรของอนุมูลอิสระในร่างกาย
3. หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 และ 5 จากรายงานการศึกษา พบว่าสารกลุ่มฟลาโวนและฟลาวาโนนซึ่งไม่มีหมู่ไฮดรอกซีที่ C3 จะมีโครงสร้างที่บิดเบี้ยว ในขณะที่สารกลุ่มฟลาโวนอลและฟลาวานอล ซึ่งมีหมู่แทนที่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งดังกล่าว จะทำให้พันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล โครงสร้างจะมีลักษณะแบนราบในระนาบเดียวกัน ส่งผลให้การ delocalization ของอิเล็กตรอนผ่านพันธะคู่เกิดได้ดีขึ้น

อนุมูลอิสระ (Free radicals)

อนุมูลอิสระ หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่หรืออิเล็กตรอนเดี่ยว (unpaired electrons or singlet electron) อยู่ในวงโคจรของอิเล็กตรอนในอะตอมหรือโมเลกุลในภาวะปกติอะตอมหรือโมเลกุลจะเสถียรเมื่อมีอิเล็กตรอนครบคู่ ดังนั้นการที่อนุมูลอิสระมีเล็กตรอนเดี่ยว ทำให้เป็นสารที่ไม่เสถียร มีช่วงครึ่งอายุสั้น (half life) ซึ่งโดยทั่วไปอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับสารอื่นใน 2 รูปแบบ คือ โดยการดึงเอาอะตอมไฮโดรเจนมาจากสารโมเลกุลอื่นที่ อยู่ข้างเคียง โดยการเพิ่มโมเลกุลของออกซิเจนเข้าไป เพื่อให้เกิดอนุมูลเปอร์ออกซิล(peroxyl radical) เนื่องจากอนุมูลอิสระมีอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่อยู่ในโมเลกุล จึงมีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลภายในร่างกาย ทำลายสมดุลของระบบต่างๆ ในร่างกาย โดยการทำลายองค์ประกอบหลักของเซลล์ เช่น ทำลายหน้าที่ของเซลล์เมมเบรน อันนำไปสู่การตายของเซลล์ ทำลายดีเอ็นเอ โดยการไปจับกับหมู่ฟอตเฟตและน้ำตาลดีออกซีไรโบส อนุมูลอิสระยังสามารถแตกพันธะเปปไทด์ของโปรตีน ทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นสาเหตุของการเกิดการกลาย

พันธุ์ และการเกิดมะเร็ง นอกจากนี้ ยังก่อให้เกิดสภาวะทางพยาธิสภาพในโรคสำคัญบางโรค เช่น ไขมันอุดตันเส้นเลือด โรคหัวใจ โรคไขข้ออักเสบ ต้อกระจกเป็นต้น อนุมูลอิสระมีมาจากทั้งแหล่งภายในและภายนอกร่างกาย ได้แก่ มลพิษในอากาศ โอโซน ไนตรัสออกไซด์ อาหารที่มีกรดไขมันอิ่มตัว หรือธาตุเหล็กมากกว่าปกติ แสงแดด ความร้อน รังสีแกมมา ยาบางชนิด เป็นต้นและแหล่งจากภายนอกร่างกาย ได้แก่ ออกซิเจน เป็นต้น

ออกซิเดชัน (Oxidation)

ออกซิเดชัน คือ ปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนให้แก่ธาตุหรือสาร หรือการลดจำนวนอิเล็กตรอนในธาตุ ธาตุโลหะที่ถูกเติมออกซิเจนจะหมดสภาพความเป็นโลหะ ธาตุคาร์บอนอินทรีย์ที่ถูกเติมออกซิเจนกลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ จะหมดศักยภาพของความที่เป็นสารที่มีพลังงานชีวภาพ จุลชีพและพืชที่สังเคราะห์แสงพยายามจะเพิ่มสถานะของคาร์บอนให้เป็น reduce carbon คือ เปลี่ยนจากคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำให้เป็นสารอินทรีย์ หรือสารอาหารเสมอ เพื่อรักษาสภาพพลังงานที่เป็นประโยชน์ต่อชีวิต ในทางตรงกันข้าม ในเมตะบอลิสม์ของเซลล์ เช่นในไมโตรคอนเดรีย ในไมโครโซม มีออกซิเจนอยู่ตลอดเวลา ออกซิเจนอาจจะเป็นพิษได้ หากมีการเติมออกซิเจนหรือการลดอิเล็กตรอนเดี่ยวออกจากธาตุและโมเลกุลบางชนิด เช่น กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว โปรตีนและดีเอ็นเอ ปฏิกิริยาที่ขาดการควบคุม ขาดการรีดักชัน ทำให้ปฏิกิริยาจะเกิดไปเรื่อยๆ ออกซิเดชันจะกลับไปเป็นอันตรายต่อเซลล์ ถ้ามีการทำให้เกิด lipid peroxidation ที่ไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์จะฉีกขาด ทำให้เซลล์ตาย เนื้อเยื่อเสื่อมสภาพและเกิดความชราตามอายุขัย ถ้าเกิดที่โปรตีนใด โปรตีนนั้นจะเสื่อมสภาพตามธรรมชาติ(denaturation) เช่น ที่ lens collagen ก็จะเป็น lens cataract ได้ ถ้าเกิดที่ low-density lipoprotein molecule (LDL) จะทำให้มีปัญหา การพาโคเลสเตอรอลในเลือด ทำให้มีการตกตะกอนของโคเลสเตอรอลและเกิด artherosclerosis ตามมา ถ้าเกิดที่ดีเอ็นเอ จะมี DNA oxidative damage หรือ เกิด genetic mutation มะเร็ง โรคทางพันธุกรรมและอื่นๆ อีก ภาวะที่มีการทำลายด้วยออกซิเดชันมากๆ เรียกว่า oxidative stress ซึ่งเป็นผลร้ายต่อเนื้อเยื่อและชีวิต นอกจากพิษจากออกซิเจนโดยตรงแล้ว เซลล์อาจถูกปฏิกิริยาออกซิเดชัน เนื่องจากสารเคมีที่เป็นพิษอีกมากมาย เช่น สารพิษตกค้างในอาหารและน้ำ สารฆ่าหญ้า สารปราบศัตรูพืช ยาบางชนิด รังสี UV X-ray เชื้อโรค ไวรัส แบคทีเรียและพยาธิ สิ่งเหล่านี้จะส่งเสริมหรือเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันให้มากขึ้น ทำให้เกิดการเพิ่มการทำลายชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น ไขมันที่ประกอบเป็นเยื่อหุ้มเซลล์ หากถูกออกซิไดซ์เซลล์จะแตก มีความผิดปกติและตายในที่สุด บางทีดีเอ็นเอในนิวเคลียสจะถูกออกซิไดซ์และทำให้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม มีการกลายพันธุ์หรือแปรสภาพเซลล์ดีให้กลายเป็นเซลล์มะเร็ง

อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องในทางชีววิทยา สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็น

องค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, NOS) และกลุ่มที่มีสารอื่นเป็นองค์ประกอบสำคัญ สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้ 2 กลุ่ม เช่น เปอร์ออกซีไนไตรท์

อนุมูลอิสระกับกระบวนการเกิดโรค

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นระหว่างการเกิดกระบวนการเผาผลาญในร่างกาย และหลุดลอดออกมาทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ก่อให้เกิดความเสียหาย มีผลกระทบต่อกระบวนการที่นำไปสู่การแสดงออกทางคลินิก ผลกระทบโดยตรงได้แก่ การเกิดเปอร์ออกซิเดชันที่เซลล์เมมเบรน และองค์ประกอบอื่นๆของเซลล์และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นที่โปรตีน และดีเอ็นเอ โดยปกติแล้วร่างกายจะมีการปกป้องโดยของเหลวภายในร่างกายที่มีส่วนประกอบเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีโลหะจับอยู่ได้แก่ เอนไซม์ และโปรตีน

เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซม์ดิสมิวเตส (SOD) กลูไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (GPX) และเอนไซม์คาตาเลส (CAT) ที่อยู่ภายในเซลล์จะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซมีอันเป็นอนุมูลเริ่มต้นและอนุมูลเปอร์ออกไซม์ ก่อนที่อนุมูลทั้งสองนี้ จะทำปฏิกิริยาต่อโดยมีโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดอนุมูล หรือสารที่มีฤทธิ์รุนแรงกว่าเดิม อย่างไรก็ตามจะยังมีอนุมูลหรือสารที่มีฤทธิ์รุนแรงจากปฏิกิริยาลูกโซ่เปอร์ออกซิเดชันที่เริ่มต้น โดยอนุมูลอิสระที่รอดพ้นจากการถูกทำลายโดยเอนไซม์ข้างต้น ซึ่งอนุมูลหรือสารที่มีฤทธิ์รุนแรงที่รอดพ้นจากการกำจัดโดยเอนไซม์ในขั้นแรกจะถูกกำจัดต่อโดยสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย ทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่หยุดลง สารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย ได้แก่ วิตามินซีที่ละลายน้ำ วิตามินอีที่ละลายในไขมัน และยูบิคควิโนน เป็นต้น

ความไม่สมดุลของการเกิดอนุมูลอิสระทำให้อนุมูลมากเกินสมดุล และเกิดภาวะที่เซลล์และร่างกายถูกออกซิไดซ์ (oxidative stress) ภาวะดังกล่าวมีบทบาทในโรคต่างๆ มากกว่า 100 โรค เช่น ภาวะผนังเส้นเลือดแดงหนาและมีความยืดหยุ่นน้อยลง เนื่องจากจากการสะสมไขมันที่ผนังหลอดเลือดทำให้หลอดเลือดตีบตันเกิดภาวะขาดเลือดชั่วขณะที่สมอง และหัวใจ โรคซึ่งเกี่ยวกับเสื่อมของประสาทโรคภูมิแพ้และโรคมะเร็ง นอกจากนี้การมีปริมาณอนุมูลอิสระที่ไม่สมดุลยังสัมพันธ์ กับลักษณะโรค หรืออาการโดยปกติอื่นๆ ดังนี้ โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน อาการสมองและไขสันหลังอักเสบ อันเนื่องมาจากโรคภูมิแพ้ โรคเนื้องอกเรื้อรัง Down's syndrome โรคตับอักเสบ โรคไขข้ออักเสบ การติดเชื้อเอชไอวี โรคแทรกซ้อนอันเนื่องมาจากเป็นโรคเบาหวาน โรคต้อกระจก แผลเปื่อย อนุมูลอิสระ มีส่วนร่วมในโรคที่เกี่ยวกับปอดหลายโรค เช่น โรคปอดที่เกิดจากการสูดใยหิน ไนโตรเจนไดออกไซม์ โอโซน ยากำจัดวัชพืช คาร์บอนเตตระคลอไรด์ หรือยารักษาโรคมะเร็ง นอกจากนี้ยังรวมถึงการมีออกซิเจนมากเกินไปในระบบร่างกาย เซลล์ที่มีหน้าที่คุ้มกันและกำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมมีความเกี่ยวข้องในการเกิดอนุมูลอิสระเช่น ในกระบวนการอักเสบ และในภาวะที่ร่างกายถูกออกซิไดซ์หรือมีอนุมูลอิสระมากเกินไปไม่สมดุลจะทำให้มีโอกาสเกิดโรคสูงขึ้น เช่น โรคเนื่องจากปอดติดเชื้อไวรัส และไข้หวัดใหญ่เป็นต้น

โดยหลักการแล้ว ภาวะ oxidative stress หรือภาวะร่างกายถูกออกซิไดซ์หรือมีอนุมูลอิสระมากเกินสมดุล เป็นผลมาจาก

1. การลดน้อยของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การเกิดการกลายพันธุ์ซึ่งมีผลกระทบต่อเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ควบคุมป้องกันการเกิดออกซิเดชัน คือทำหน้าที่ขจัดกำจัดหรือต้านอนุมูลอิสระ เอนไซม์ดังกล่าวนี้ ได้แก่ เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซม์ดิสมิวเตส เป็นต้น การกลายพันธุ์ทำให้เอนไซม์เหล่านี้ ไม่ทำงานหรือทำงานบกพร่อง หรือสาเหตุจากโรคที่ทำให้เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดออกซิเดชัน น้อยลงหมดไป รวมทั้งสาเหตุทางโภชนาการ คือ ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชันจากอาหารไม่เพียงพอ ทั้งหมดนี้ทำให้ร่างกายอยู่ในภาวะถูกออกซิไดซ์เกิดอาการผิดปกติและตามด้วยโรคหรือการเจ็บป่วย

2. การเกิดอนุมูลอิสระและผลิตผลที่เกี่ยวข้องเพิ่มขึ้น อนุมูลอิสระและผลิตผลที่เกี่ยวข้องจะเกิดขึ้นในภาวะต่างๆ เช่น การได้รับออกซิเจนในปริมาณที่สูงหรือการที่เซลล์ได้รับออกซิเจนใหม่ภายหลังจากภาวะต่างๆ เช่น การได้รับออกซิเจนในปริมาณที่สูง หรือการที่เซลล์ได้รับออกซิเจนใหม่ภายหลังจากภาวะขาดเลือดชั่วขณะ แม้ว่าออกซิเจนที่ได้รับจะไม่สูงก็ตาม แต่การทำงานของเอนไซม์ในเซลล์ภายหลังภาวะขาดเลือด จะบกพร่องทำงานได้ลดลง ทำให้การเผาผลาญออกซิเจนผิดปกติ เกิดอนุมูลอิสระ และผลิตผลที่เกี่ยวข้องขึ้น การได้รับสารพิษซึ่งเป็นอนุมูลอิสระ เช่น อนุมูล NO_2^* อนุมูล $\dot{L}$ และอนุมูล $L\dot{O}$ จากอาหาร หรือมลพิษ หรือในภาวะที่ระบบมีการผลิตอนุมูลอิสระถูกกระตุ้น เช่น ระบบภูมิคุ้มกันถูกกระตุ้น หรือในภาวะอักเสบ

ภาวะที่ร่างกายถูกออกซิไดซ์หรือมีอนุมูลอิสระมากเกินไปไม่สมดุล ทำให้เกิดความเสียหายต่อชีวโมเลกุลที่สำคัญในการดำรงชีพ ชีวโมเลกุลที่เป็นเป้าหมาย คือ ดีเอ็นเอ โปรตีน และไขมัน การตายของเซลล์ เกิดโดยกลไกที่สำคัญ 2 กลไก คือ กลไกการตายของเนื้อเยื่อ หรือเซลล์จากสารพิษหรือจากเชื้อโรคต่างๆ (necrosis) และกลไกการตายตามอายุขัยตามธรรมชาติของเซลล์นั้นๆ โดยการทำลายตัวเองของเซลล์ (apoptosis) ซึ่งทั้งสองกลไกนี้ มีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดภาะที่เซลล์หรือร่างกายถูกออกซิไดซ์ หรือมีอนุมูลอิสระมาก ในการตายของเซลล์แบบแรก เซลล์จะบวมหรือพองตัวและแตกออก ทำให้องค์ประกอบและสิ่งที่อยู่ในเซลล์กระจายออกมา ยังบริเวณล้อมรอบ ทำให้มีผลกระทบต่อเซลล์อื่นๆ ที่อยู่ใกล้เคียงสิ่งที่อยู่ในเซลล์ที่ส่งผลกระทบต่อเซลล์อื่น ได้แก่ เอนไซม์หรือสารที่ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์คาตาเลส กลูตาไทโอน รวมทั้งสารโปรออกซิแดนท์ (pro-oxidant) สารโปรออกซิแดนท์เป็นสารที่เร่งปฏิกิริยา การเกิดอนุมูลอิสระ หรือสารที่สามารถเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระ เช่น อิออนของคอปเปอร์และเหล็ก และโปรตีนฮีม ในกระบวนการตายแบบ apoptosis จะไม่ปลดปล่อยสิ่งที่บรรจุอยู่ในเซลล์ออกมาจึงไม่ทำให้เกิดการรบกวนแก่เซลล์แวดล้อม หรือเซลล์อื่นที่อยู่ใกล้เคียง การตายของเซลล์แบบ apoptosis อาจไปเร่งหรือก่อให้เกิดโรคบางโรค เช่น โรคที่เกี่ยวกับการเสื่อมของระบบประสาท

โรคบางโรคสามารถเกิดขึ้นจากภาวะ oxidative stress โดยตรง เช่น การฉายรังสีหรือการได้รับรังสีทำให้เกิดการแตกตัวเป็นอิออน $OH^{\cdot}$ โดยเฉพาะโมเลกุลของน้ำจะแตกตัวทำให้มีอนุมูล hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) เกิดขึ้น อนุมูล $OH^{\cdot}$ จะทำลายโปรตีน ดีเอ็นเอ และไขมัน โดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในโรคส่วนใหญ่ภาวะการถูกออกซิไดซ์หรือมีอนุมูลอิสระมากเกินสมดุลไม่ได้เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรค แต่เป็นผลที่เกิดขึ้นตามมาภายหลังและทำให้โรคมีการพัฒนาการกำเริบอย่างรวดเร็ว การที่เนื้อเยื่อเสียหายหรือถูกทำลายจากการติดเชื้อ การบาดเจ็บ การได้รับสารพิษ อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำผิดปกติ จะเป็นสาเหตุทำให้ปริมาณของสารสื่อต่างๆ ที่เกี่ยวกับการบาดเจ็บ ได้แก่ พรอสตาแกลนดิน ลิวโคไตรอีน อินเตอร์ลิวคิน และไซโคไคน์ต่างๆ เช่น tomor necrosis factors (TNFs) ทั้งหมดนี้พบว่า ทั้งหมดนี้มีบทบาท นำไปสู่การเกิดอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น

สารอนุมูลอิสระเป็นตัวกลางในขบวนการอักเสบ และเมื่อมีปฏิสัมพันธ์กับเกล็ดเลือด neutrophils, macrophage และเซลล์อื่นๆ สามารถเกี่ยวข้องกับขบวนการการสังเคราะห์ eicosanoids และการกระตุ้นการหลั่ง cytokines หลายชนิด ทำให้มีการลุกลามของขบวนการอักเสบจากอวัยวะหนึ่ง (เช่น ตับ) ไปสู่อีกอวัยวะ (เช่น ไต ปอด ฯลฯ) ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress และการทำงานของอวัยวะต่างๆ ล้มเหลวสารอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ เป็นอนุมูลที่ถูก สร้างขึ้นในร่างกายจาก L-arginine โดยเอนไซม์ Nitric oxide synthase (NOS) และนอกจากนี้ยังสร้างขึ้นโดย activated macrophage และ endothelial cellในการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ ซึ่งออกฤทธิ์เป็น cytotoxic free radical แต่ NO ก็มีฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วย ได้แก่ ระงับการจับกลุ่มของเกล็ดเลือดและยับยั้ง leukocyte adhesion NO จึงมีบทบาทเป็นสารสื่อกลางที่คอยควบคุมปฏิกิริยาการอักเสบไม่ให้มากเกินไป

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

ได้มีการศึกษาเรื่องการต้านอนุมูลอิสระไว้มากมาย และมีการให้คำจำกัดและอธิบายไว้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือสารใดๆ ที่ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของสารเริ่มต้นในกระบวนการ Lipid peroxidation

1. สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มดังนี้
   1.1 กลุ่มที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง
      - เป็นพวกเอนไซม์และโคเอนไซม์มี 6 ตัวคือ Catalase (CAT) Glutathione Peroxidase (GPX) Glutathione S-Transferase (GST) Glutathione Reductase (GR) และ Superoxide Dismutase (SOD) เป็นต้น
      - เป็นโปรตีน ประมาณ 10 ตัวคือ Lipid acid, ceruloplasmin, Albumin, Transferrine, Haptoglobin, Uric acid, Bilirubin และ Hemopexin เป็นต้น

   1.2 กลุ่มที่ได้จากนอกร่างกาย
      - วิตามินเอ และเบต้าแคโรทีน

- วิตามินซี
- วิตามินอี
- กลูตามีน
- ฟลาโวนอยด์ (สารที่สีในผัก และผลไม้)
- ชา โดยเฉพาะชาใบขาว
- สมุนไพรบางชนิด
- เซเลเนี่ยม

สารต้านอนุมูลอิสระ พบมากในผักและผลไม้เช่น วิตามิน A, C, E และเบต้าคาโรทีนซึ่งสารดังกล่าวสามารถลดอัตราการเกิดมะเร็งได้หลายอย่าง เช่น มะเร็ง ปอด ปากมดลูก ลำไส้ใหญ่ กระเพาะ antioxidation สามารถป้องกันการทำลายเซลล์จาก oxygen free radical ซึ่งสามารถทำลายสารพันธุกรรมในเซลล์และก่อให้เกิดมะเร็งในภายหลัง

2. หน้าที่ของสารต้านอนุมูลอิสระ

2.1 ป้องกันการก่อตัวของอนุมูลอิสระทำให้ออกซิเจนที่จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนรูปที่ไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้ นอกจากนี้ สารต้านอนุมูลอิสระทำหน้าที่ยับยั้ง พวกโลหะหนัก เหล็กซึ่งเป็นตัวเริ่มต้นในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

2.2 ยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระโดยทำให้อนุมูลอิสระนั้นคงตัว และเป็นการหยุดก่อตัวใหม่

2.3 ช่วยซ่อมแซมความเสียหายโดยการทำให้อนุมูลอิสระนั้นคงตัว และเป็นการหยุดการก่อตัวใหม่

2.4 ช่วยกำจัดและแทนที่โมเลกุลที่ถูกทำลายเพราะสารเหล่านี้เป็นพิษต่อร่างกาย

3. Lipid peroxidation

คือ ปฏิกิริยาที่เกิดเมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัว เนื่องจากไขมันเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ Lipid peroxidation เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต

อนุมูลอิสระจะเกิดปฏิกิริยาที่เป็นแบบปฏิกิริยาลูกโซ่ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเป็นขั้นที่อนุมูลอิสระถูกสร้างหรือผลิตขึ้น เรียกขั้นตอนนี้ว่าขั้นตอนอินนิทิเอชัน (initiation step) ขั้นที่สองเป็นขั้นที่อนุมูลอิสระถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระตัวอื่นต่อๆกันไป เรียกว่าขั้นพรอพาเกชัน (propagation step) และขั้นสุดท้าย เรียกว่า ขั้นเทอร์มิเนชัน (termination step) เป็นขั้นหยุดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระเป็นขั้นตอนที่มีการรวมกันของอนุมูลอิสระ 2 อนุมูล ได้เป็นสารที่มีความเสถียร โดยทั่วไปการที่โมเลกุลหรืออะตอมของสารที่มีอิเล็กตรอนเข้าคู่กันครบเสียอิเล็กตรอนไปกลายเป็น

อนุมูลอิสระได้นั้น ต้องอยู่ในสภาวะอุณหภูมิสูง แต่ก็มีโมเลกุลอีกหลายชนิดที่กลายเป็นอนุมูลอิสระได้เมื่ออยู่ในสภาวะปกติ ซึ่งรวมถึงสารชีวโมเลกุลต่างๆที่พบในสิ่งมีชีวิตด้วย ซึ่งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระที่มักพบในสภาวะปกติของสิ่งมีชีวิตมีขั้นตอนการเกิด Lipid peroxidation ดังนี้

3.1 Initiation เป็นกระบวนการที่อนุมูลอิสระ($R^{\bullet}$)ดึงอิเล็กตรอนจากกรดไขมันไม่อิ่มตัว (-RH) ที่บริเวณปลายสายโซ่ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระของกรดไขมันไม่อิ่มตัว($-R^{\bullet}$)

$$-RH + R^{\bullet} \longrightarrow -R^{\bullet} + RH$$

$$-R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow -ROO^{\bullet} \text{ (Peroxy Radical)}$$

3.2 Propagation เป็นขบวนการการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่อนุมูลอิสระของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งเป็น peroxy radical ($-ROO^{\bullet}$)จะทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัว ตัวอื่นบริเวณสายโซ่

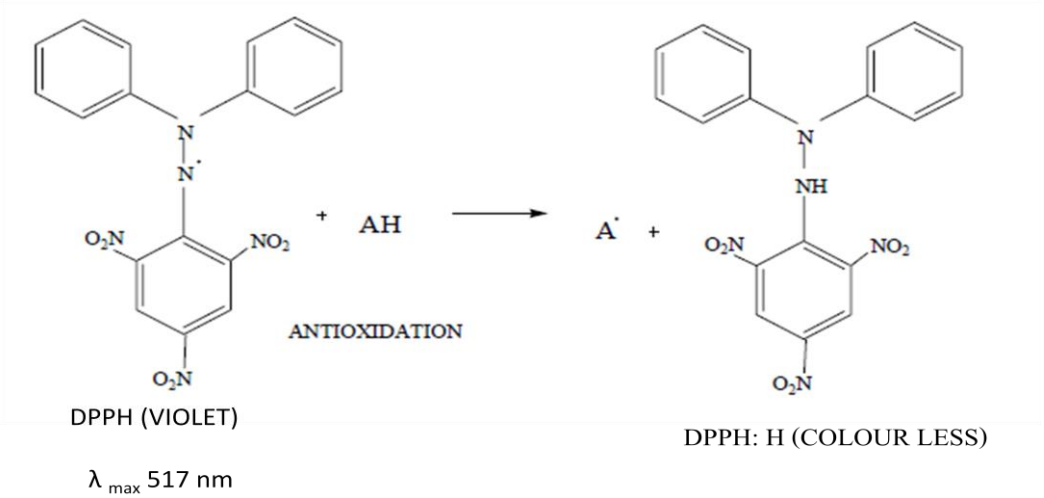
$$-ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow -ROOH + -R^{\bullet}$$

3.3 Termination เป็นขบวนการที่อนุมูลอิสระ 2 ตัวเกิดการรวมตัวกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียรดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$-ROO^{\bullet} + -ROO^{\bullet} \longrightarrow ROOR^{\bullet} + O$$

8. การทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี DPPH

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างด้วยสารละลาย 2, 2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Pourmorad et al., 2006) ซึ่งเป็น free radical มีลักษณะสีม่วง เมื่อวัดค่าดูดกลืนแสง โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลให้ความยาวคลื่นสูงสุดประมาณ 517 นาโนเมตร เมื่อผสมสารตัวอย่างกับ DPPH (free radical) สารตั้งต้นจะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่ DPPH สีของสารละลาย DPPH เปลี่ยนจากสารละลายสีม่วงเป็นสีเหลือง ดังปฏิกิริยาในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 สมการการเกิดปฏิกิริยา หลังจากการเติมสารต้านอนุมูล

โดย DPPH (free radical) และAH เป็นตัวให้ไฮโดรเจนอะตอม โดยโมเลกุล DPPH (free radical) ถูกยับยั้งด้วย AH ได้โมเลกุล DPPH เมื่อสังเกตสีสารละลาย DPPH เปลี่ยนจากสารละลายสีม่วงเป็นสีเหลือง ถ้ามีสีเหลืองมาก แสดงว่าสารตัวอย่างสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดี

วิธีนี้มีข้อดีคือ เป็นวิธีง่าย ใช้เครื่องมือที่มีทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านอนุมูลจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรตินอยด์ที่มีการดูดกลืนแสงในย่านเดียวกัน

สำหรับข้อด้อยของวิธีนี้คือ อนุมูล DPPH• มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้ นอกจากนี้ โครงสร้างทางเคมีของ DPPH• ที่แสดงจะเห็นว่าอิเลคตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตร ทำให้สารต้านอนุมูลที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาขจัดอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง ทั้งๆที่ สารต้านอนุมูลนั้นมีฤทธิ์ดีในการขจัดอนุมูลเปอร์ออกซี นอกจากนี้สารรีดิวซ์สามารถทำให้สี DPPH• จางลงได้อีกด้วย

9. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Basic Assay Techniques for Anti Microbial Activity)

ฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Jorgensen *et.al.,*1999) สามารถทำการทดสอบได้ 2 วิธี ดังนี้

9.1 Dilution Method

โดยการเจือจางสารเคมีหรือสารสกัดในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ให้มีความเข้มข้นในระดับต่างๆ เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่ผสมสารเคมี วัดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ การเจือจางสามารถเจือจางในอาหารแข็ง (Agar Dilution Method) ซึ่งเหมาะกับเชื้อราที่มีการเจริญแผ่ไปบนผิวหน้าอาหาร และการเจือจางในอาหารเหลว (Broth Dilution Method) ซึ่งเหมาะกับเชื้อแบคทีเรียหรือยีสต์ หรือเชื้อราที่ส่วนขยายพันธุ์มีการเจริญคล้ายยีสต์

9.2 Diffusion Method

โดยการทำให้ตัวยาหรือสารสกัดจากจุดใดจุดหนึ่งซึมไปในอาหารที่ผสมเชื้อจุลินทรีย์จำนวนที่เหมาะสม แล้วสารสกัดไปมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยวัดผลจากบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Zone of Inhibition, Clear Zone) Diffusion Method ยังสามารถแบ่งได้เป็นอีก 2 วิธี คือ

9.2.1 Paper Disc Methods ใช้กระดาษกรองเป็นแผ่น disc สำหรับหยดสารสกัดเพื่อให้สารสกัดซึมจากกระดาษกรองลงไปในจานเลี้ยงเชื้อ

9.2.2 TLC Disc Methods ใช้ TLC เป็นแผ่น disc สำหรับวางแผ่น silica gel บนแผ่นกระจก TLC บริเวณที่ตรวจพบ fraction และนำแผ่น TLC disc วางในจานเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบต่อไป

10. จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ

10.1 แบคทีเรีย (Bacteria)

10.1.1 *Bacillus subtilis* จัดอยู่ในวงศ์ Bacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.7 –0.8 x 2 –3 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นสาย สร้างเอ็นโดสปอร์ (endospore) 1 อันต่อเซลล์ ขนาด 0.5 x 1.5 –1.8 ไมโครเมตร หายใจโดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลกตรอนตัวสุดท้าย มีความหลากหลาย ในทางชีวเคมีที่ทำให้สามารถปรับตัวให้อยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่รุนแรง หรือ extreme condition ต่างๆ ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูง และสภาพเป็นด่าง ได้อย่างดี มีหลายชนิดสามารถเจริญเติบโตได้แม้ในที่อุณหภูมิสูงถึง 60°C ชอบอุณหภูมิปานกลาง อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 45-55 องศาเซลเซียส เชื้อสร้างเอกโซเอนไซม์ใช้แป้ง แพคติน และเคซินได้ พบเชื้ออยู่อาศัยได้ทั่วไปในดิน โดยทั่วไปเชื้อนี้จะไม่ก่อโรคในคนปกติ แต่อาจก่อโรคได้โดยการปนเปื้อนไปกับอาหารแล้วทำให้เกิดอาหารเป็นพิษขึ้น และอาจทำให้แป้งขนมปังเน่าเสียได้ หรือบางครั้งทำให้เกิดโรคได้ถ้ามีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย

10.1.2 *Staphylococcus aureus* จัดอยู่ในวงศ์ Micrococaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 – 1.2 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นกลุ่ม ไม่เคลื่อนที่ เจริญเติบโตได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจน บนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดด่างที่ 4.8-7.4 โคโลนีมีลักษณะนูนทึบแสง เป็นมัน ขนาด 1-2 มิลลิเมตร มีสีเหลืองทอง สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ดี ปะปนอยู่ในอากาศ ฝุ่นละออง น้ำ อาหาร มนุษย์และสัตว์เป็นแหล่งของเชื้อพบอยู่ตามทางเดินหายใจ ลำคอ และผิวหนังถึง 50% มักพบบริเวณผิวมันและเยื่อบุเมือก หรือบริเวณลำคอส่วน Oropharynx และ Nasopharynx *S.aureus* ทำให้เกิดโรคในอวัยวะต่างๆและเนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนของร่างกาย ที่พบบ่อยคือทำให้เกิดโรคฝีหนอง เช่น ฝีตามรูขุมขน ฝีฝักบัว กล้ามเนื้ออักเสบ และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เป็นต้น บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ ที่เรียกว่า เอนเทอโรทอกซิน ซึ่งทนความร้อนได้ดี ทำให้อาหารเป็นพิษ เป็นสาเหตุให้เกิดอาการเจ็บป่วยในมนุษย์ การรับประทานอาหารที่ปนเปื้อน สารพิษ enterotoxin ของเชื้อ *S. aureus* เข้าไป ประมาณร้อยละ 30-50 ของ *S. aureus* สร้างสารพิษชนิดนี้ ซึ่งแบ่งออกเป็น 8 ชนิด ได้แก่ ชนิด A , B , C1 , C2 , C3 , D , E, และ H สารพิษนี้มีคุณสมบัติพิเศษ คือ ทนต่อความร้อนได้ดีมาก ต้มเดือดนานครึ่งชั่วโมงก็ยังไม่ถูกทำลาย อาหารที่มีเชื้อและสารพิษปนเปื้อนอยู่จะไม่มีกลิ่น สี หรือ รสผิดปกติไป ผู้ป่วยจะเกิดอาการของอาหารเป็นพิษขึ้น หลังจากรับประทาน

อาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไปประมาณ 1-6 ชั่วโมง เนื่องจากสารพิษไปออกฤทธิ์ที่เยื่อบุลำไส้เล็ก ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และ ท้องเดิน ส่วนมากไม่มีไข้ ในรายรุนแรงอาจช็อคได้ แต่ส่วนใหญ่อาการจะดีขึ้นใน 8-24 ชั่วโมง อาการรุนแรงของโรคขึ้นกับจำนวนสารพิษในอาหารที่รับประทานเข้าไป

10.1.3 *Escherichia coli* จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง มีขนาด 0.3 –1.0 x 1.0 –6.1 ไมโครเมตร ถ้าเลี้ยงไว้ใหม่ ๆ จะมีลักษณะ coccobacilli ซึ่งเป็นแท่งที่มีลักษณะสั้นและอ้วนแต่เมื่อเลี้ยงไว้นานจะเป็นแท่งที่ยาวขึ้นทั้งนี้ลักษณะรูปร่างจะขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ ย้อมติดสีแกรมลบ ไม่มีแคปซูล ไม่สร้างสปอร์ *E. coli* สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสได้ เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา พบในอุจจาระของคนเนื่องจาก E.coli เป็นแบคทีเรียที่ ปกติเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ใหญ่ของคนและสัตว์ บางครั้งพบในน้ำใช้ อาหาร น้ำแข็ง เครื่องดื่ม ซึ่งก็แสดงว่าในน้ำ อาหาร หรือเครื่องดื่มนั้นๆ มีการปนเปื้อนของ อุจจาระของคนและสัตว์ ดังนั้นจึงใช้ *E.coli* เป็นดรรชนีบ่งชี้การปนเปื้อนอุจจาระ โดยไม่ทำให้เกิดโรค แต่มีบางสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่

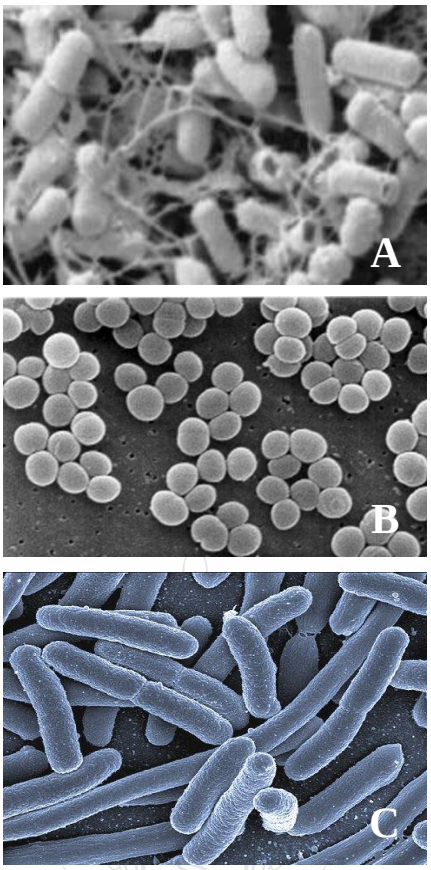
- Enterovasive *E. coli* สามารถบุกรุกเซลล์เยื่อบุของลำไส้ใหญ่ทำให้เกิดอาการคล้ายโรคบิด คือท้องร่วง ถ่ายเป็นมูกเลือดและมีไข้

- Enterotoxigenic *E. coli* ทำให้เกิดอาการท้องร่วงในเด็กทารกตามสถานรับเลี้ยงเด็ก ส่วนในผู้ใหญ่ทำให้เกิดอาการอาเจียน

- Enteropathogenic *E. coli* ทำให้เกิดอาการท้องร่วงในทารกแรกคลอด

- Enterohemorrhagic *E. coli* ทำให้เกิดการตกเลือดในลำไส้ใหญ่

- Enteroautoagglutinae *E. coli* ทำให้เกิดท้องร่วงในเด็กอายุต่ำกว่า 6 เดือน



ภาพที่ 7 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ A. *Bacillus subtilis*,
B. *Staphylococcus aureus* และ **C.** *Escherichia coli*

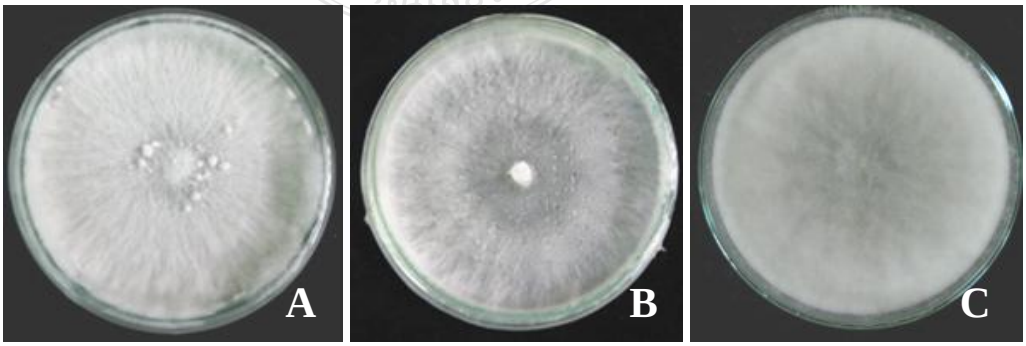
10.2 เชื้อราสาเหตุโรคพืช (Plant Pathogenic Fungi)

10.2.1 และ 10.2.2 *Sclerotium* spp.

เป็นเชื้อราอยู่ใน Division Eumycota Subdivision Deuteromycotina Form-class Hyphomycetes Form-order Agonomycetales Form-family Agonomycetaceae เป็นราที่ไม่สร้าง conidium หรือสปอร์ชนิดใดๆ โดย *Sclerotium rolfsii* เป็นสาเหตุโรคที่สำคัญของพืช *S. rolfsii* สร้างเส้นใยสีขาวหรือสีอ่อน มี clamp connection เจริญเติบโตได้รวดเร็ว และสร้าง sclerotium สีน้ำตาล ลักษณะเป็นเม็ดกลมประกอบด้วยเส้นใยอัดตัวกันเป็นชั้นหลายชั้น และเป็นเนื้อเยื่อแบบ pseudoparenchyma เป็นสาเหตุโรค damping off ของกล้าพืช โรครากเน่าและโคนเน่าของพืชหลายชนิด ปัจจุบันพบ perfect stage จัดอยู่ใน subdivision Basidiomycotina คือ รา *Athelia rolfsii* (วิจัย, 2546)

10.2.3 *Lasiodiplodia* sp.

เป็นเชื้อราอยู่ใน Division Eumycota Subdivision Deuteromycotina Form-class Coelomycetes Form-order Sphaeropsidales Form-family Sphaeropsidaceae (วิจัย, 2546) เชื้อรา *L.theobromae* เป็นเชื้อราที่พบอย่างแพร่หลายทั้งในเขตร้อนและกึ่งร้อน เป็นเชื้อราก่อโรคในพืชและผลไม้ที่สำคัญหลายชนิด เช่น โรค crown rot ของกล้วย โรคเน่าของมะม่วง พืชตระกูลส้ม เงาะ ทุเรียน ลิ้นจี่ ลำไย และโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะพันธุ์โรงเรียนเป็นต้น (กาญจนาและเอกชัย, 2552) เชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon&Maubl.(synonyms: *Botryodiplodia theobromae* Lat., *Diplodia natalensis* Pole Evans.) เจริญได้ดีบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เส้นใยเมื่อยังอายุน้อยมีสีขาวละเอียดและค่อนข้างฟูซึ่งจะเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเชื้อหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน เมื่อโคโลนีแก่เส้นใยจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเทาดำ เส้นใยมีผนังกั้นมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เมื่อเชื้อราอายุมากขึ้นเส้นใยจะสร้าง fruiting body ที่เรียกว่า conidiomata แบบ pycnidia ซึ่งอาจมีช่องเดียวหรือหลายช่องก็ได้ ภายในประกอบด้วยเส้นใย paraphyses ใสไม่มีสี รูปร่างทรงกระบอก มีผนังกั้นบางครั้งอาจพบว่ามีการแตกกิ่งก้านสาขา มี conidiogenous cells ใสไม่มีสีเช่นกัน โดย conidiogenous cells มีหน้าที่ในการสร้างconidia ซึ่งเป็น asexual spores โดยสร้างอยู่บนปลายของconidiophores ลักษณะของ conidia เมื่ออ่อนจะมีเพียงเซลล์เดียว ใสไม่มีสี รูปร่างค่อนข้างรีจนถึงค่อนข้างกลม (subovoid to ellipsoid-ovoid) ปลายด้านหนึ่งกลมมน อีกด้านสอบลงคล้ายกรวย บริเวณที่กว้างที่สุดของตัวเซลล์คือช่วงกลาง ไม่มีผนังกั้น ผนังเซลล์หนาประกอบไปด้วย granular และผนังเซลล์จะยังคงไม่มีสีไปจนกว่าจะถูกปล่อยออกมาจาก pycnidia จากนั้น conidia จะเริ่มสร้างเม็ดสีน้ำตาลเข้ม และสร้างผนังกั้น (septum) 1 ชั้นตรงกลาง ทำให้แบ่งออกเป็น 2 เซลล์ มีรูปร่างรีคล้ายไข่ มีขนาดประมาณ 26.2 –27 x 14 –14.4 ไมโครเมตร ผนังด้านนอกหนา 2 ชั้น และมีการสร้างเม็ดสีเมลานินบนผิวเซลล์ด้านในเรียงตัวเห็นเป็นริ้วในแนวยาว

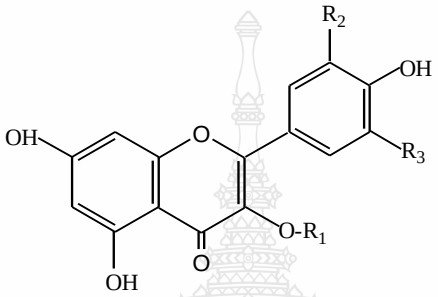


ภาพที่ 8 เชื้อราที่ใช้ทดสอบ A. *Sclerotium* sp.7,

B. *Sclerotium* sp.8 และ **C.** *Lasiodiplodia* sp.

11. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Jung *et al*. (2003) ประเมินการต้านอนุมูลอิสระของเกสรเพศผู้บัวหลวงด้วย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่าสารสกัดเกสรเพศผู้บัวหลวงในชั้นเมทานอลแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในระบบ Peroxynitrite และจากการแยกสารสกัดในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด เช่น dichloromethane (CH_2Cl_2), ethyl acetate (EtOAc) และ n-butanol(n-BuOH) สารสกัดในชั้นเอทิลอาซิเตท แสดงการต้านอนุมูลอิสระในระดับสูง เมื่อทำให้บริสุทธ์ด้วยซิลิกาเจลและ SephadexLH-20 ด้วยคอลัมภ์โครมาโตรกราฟฟี ได้มีการพบกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งส่วนมากให้ผลการต้านอนุมูลอิสระ 7 ชนิด คือ kaempferol, kaempferol-3-O-β-D-glucuronopyranosyl methylester และอื่นๆ ดังนี้



Kaempferol (1): R_1 = H, R_2 = H, R_3= H

Kaempferol-3-O-β-D-glucuronopyranosyl methyl ester(2): R_1= Glu-Me, R_2=R_3=H

Kaempferol -3-O-β-D-glucuronopyranoside(3): R_1= Glu, R_2=R_3=H

Kaempferol -3-O-β-D-glucuronopyranoside(4): R_1= Gal, R_2=R_3=H

Myricetin-3',5'-dimethylether-3-O-β-D-glucuronopyranoside(5): R_1= Glu, R_2=R_3=OCH_3

Kaempferol -3-O-α-l-rhamnopyranosyl-(1 → 6)-β-D-glucopyranoside (6):

R_1=Rha-(1 → 6)-Glu,R_2=R_3=H

Kaempferol -3-O-β-D-glucuronopyranoside (7):R_1=Gln,R_2=R_3=H

จากงานวิจัยของ Agnihotri *et al*. (2008) พบสารประกอบใหม่จากใบบัวหลวงคือ 24 (R)-ethylcholest-6-ene-5α-β-D-glucopyranoside และสารเมตาโบไลท์อีก 11 ชนิด โดยใช้วิธีสเปคโตรสโคปีและ D1,D2 NMR ในการจำแนก พบว่า (R)-roemerin (IC_{50} = 0.2 และ 4.8 µg/ml) มีฤทธิ์ต้านทานเชื้อรา *Candida albicans* และฤทธิ์ต้านทานเชื้อมาลาเรีย

การสกัดใบบัวหลวง *(Nelumbo nucifera* Gaertn.) ด้วยวิธี high-speed counter-current chromatography (HSCCC) จากการนำสารสกัดรวมจากใบบัวหลวงมาวิเคราะห์แยกได้เป็นอัลคาลอยด์ 5 ชนิด คือ anonaine, pronuciferine, N-nornuciferine, nuciferine และ armepavine (Hu *et al*., 2010)

Yang *et al*. (2007) สกัดผงจากเหง้าบัวด้วยตัวทำละลายหลายชนิดที่มีขั้วแตกต่างกัน ประเมินการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเหง้าบัวด้วย 2,2'-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH)และ β-carotene bleaching assay พบว่าเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ได้สารสกัดสูงสุด สารสกัดในอะซิโตนให้ค่า total Phenolics content สูงสุด สารสกัดในเมทานอลและอะซิโตนให้ค่าต้านอนุมูลอิสระจาก DPPH สูงสุดที่ 66.7 mg/L และ 133.3 mg/L สารสกัดทั้งหมดแสดงสัมประสิทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity coefficient, ACC) สูงกว่า ascorbic acid คุณสมบัติของตัวทำละลายมีผลต่อปริมาณสารที่สกัดได้ Phenolics content และปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเหง้าบัว

Phonkot *et al*. (2008) ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของเกสรตัวผู้บัวหลวงปทุม สัตตบงกช บุณฑริก และสัตตบุตย์ ด้วย 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) ของสารสกัดในเมทานอลจากบัว 4 ชนิด มีค่า 68.3 6.30, 62.22 4.00, 31.60 3.40 และ 40.90 1.50 g/mL ตามลำดับ ซึ่งสัตตบงกชมีปฏิกริยาการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด

ในประเทศจีนได้มีการนำส่วนสกัดต่างๆของบัวมาใช้ให้เป็นประโยชน์ทางด้านยาสมุนไพร รักษาโรคตามขั้นตอนการรักษาตามแพทย์แผนจีน และมีการพัฒนาปรับปรุงสมุนไพรไปใช้ทางด้านสุขภาพโดยการกิน จากงานวิจัยของ Li and Xu (2008) ที่นำเอาสาร Quercetin ที่มีอยู่ในสารสกัดจากใบบัวมีฤทธิ์สามารถต้านทานแบคทีเรีย

Liao *et al*. (2010) ยอดอ่อนในเมล็ดบัวมักใช้เป็นสารต้านการอักเสบ มีการศึกษาแป้งในยอดอ่อน (lotus plumule polysaccharide, LPPS) จากการศึกษานี้ อาจใช้ LPPS ในการรักษาโรคเบาหวาน อันเนื่องมาจากศักยภาพในการต้านการอักเสบ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สายพันธุ์บัว

บัวที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 6 พันธุ์ (ภาพที่ 9) ดังนี้

1. พันธุ์บัวหลวง รวบรวมจากบริเวณภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี 2 ชนิด คือ บัวหลวงสัตตบงกช (ดอกสีชมพู) บัวหลวงสัตตบุตย์ (ดอกสีขาว) ซึ่งมีชั้นของกลีบดอกหลายชั้น และพันธุ์บัวหลวงเก็บจากกรมการปกครอง อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี ซึ่งเป็นบัวหลวงสีชมพู มีกลีบดอกอยู่รวมกันหลวมๆ

2. พันธุ์บัวสาย จากพิพิธภัณฑ์บัว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี 3 ชนิด คือ บัวขาวมงคล (ดอกสีขาว) บัวมะเหมี่ยว (ดอกสีแดง) และบัวฉลองขวัญ (King of Siam ดอกสีน้ำเงิน)

2. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

2.1 แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์

- แบคทีเรียแกรมบวก
  - *Bacillus subtilis* TISTR No.008
  - *Staphylococcus aureus* TISTR No.1466
- แบคทีเรียแกรมลบ
  - *Escherichia coli* TISTR No.780

2.2 เชื้อรา 3 สายพันธุ์ แยกจากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ได้แก่ เชื้อรา *Sclerotium* sp.7 (แยกเชื้อจากมันฝรั่ง), *Sclerotium* sp.8 (แยกเชื้อจากกล้วยไม้รองเท้านารี) และ *Lasiodiplodia* sp. (แยกเชื้อจากส้มโอ) และเก็บรักษาเชื้อราเหล่านี้ในอาหารพีดีเอ (Potato Dextrose Agar, PDA)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ ใช้เชื้อแบคทีเรียของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย สำหรับเชื้อราได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

ภาพที่ 9 ลักษณะดอกบัวหลวงและบัวสายที่ใช้ในการทดสอบ

A1-2. ดอกบัวหลวงสัตตบงกช

B1-2. ดอกบัวหลวงสัตตบุตย์

C1-2. ดอกบัวหลวงปทุม

ภาพที่ 9 (ต่อ) ลักษณะดอกบัวหลวงและบัวสายที่ใช้ในการทดสอบ

D1-2. ดอกบัวสายมะเหมี่ยว

E1-2. ดอกบัวสายขาวมงคล

F1-2. ดอกบัวสายฉลองขวัญ

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1 การสกัดสารจากพืชและการทดสอบทางเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- ขวดแช่สกัด
- ชุดกรอง suction พร้อมเครื่องปั๊ม 1 ชุด
- กระดาษกรองเบอร์ 4
- โครมาโทรกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin-layer chromatography, TLC) สำเร็จรูป เคลือบ ซิลิกาเจล 60 จีเอฟ$_{254}$ (Silica gel GF$_{254}$ Merck) ฉาบบนแผ่นอะลูมิเนียม มีความหนาของซิลิกา 0.2 มม. การตรวจสอบหาจุด (spot) ของแผ่น TLC ใช้วิธีมองด้วยตาเปล่า (เฉพาะสารที่มีสี) และดูด้วยแสงอุตราไวโอเลตของเครื่อง UV
- เครื่อง Rotary evaporator
- Column ขนาด 3 เซนติเมตร และ 1.3 เซนติเมตร
- ขวดเก็บสาร 50 มิลลิลิตร
- Volumetric flask ขนาด 10 ml และ 50 ml
- ปิเปต 5 ml (Gruaduate), 1 ml (transfer)
- เครื่อง UV-Visible Spectroscopy

3.1.2 สารเคมี

Ethanol, Hexane, Chloroform, Dichloromethane, Ethyl acetate และ Silica gel G$_{60}$ สำหรับคอลัมน์โครมาโทรกราฟี (Column chromatography) สารเคมีทุกชนิดที่ใช้เป็นเกรดวิเคราะห์

3.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH

3.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- Volumetric flask ขนาด 10 ml และ 50 ml
- ปิเปต 5 ml (Gruaduate) , 1ml (transfer) และ 10 ml (transfer)
- เครื่อง UV-Vissible Spectroscopy ยี่ห้อ Jasco V 570

3.2.2 สารเคมี

- Absolute Ethanol
- DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
- Vitamin E

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัด

3.3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath)
- กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope)
- ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (Incubator)
- เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (Vortex mixer)
- เครื่องชั่ง (Balance)
- แผ่นแม่เหล็กให้ความร้อนพร้อมที่กวนสาร (Magnetic stirer)
- เครื่องนับโคโลนี (Colony counter)
- ปิเปตขนาด 1 ml (transfer) , 5 ml (transfer) และ 10 ml (transfer)
- ขวดเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบมีฝาปิดขนาด 500 ml
- ลูปและเข็มเขี่ยเชื้อ (Loop and needle)
- ปากคีบ (Forceps)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- กระดาษกรอง
- เครื่องแก้ว ได้แก่ จานเลี้ยงเชื้อ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซ็นติเมตร) บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ หลอดทดลอง กรวยกรอง และแท่งแก้วคน เป็นต้น

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

- Nutrient Agar (NA)
- Nutrient Broth (NB)
- Potato Dextrose Agar (PDA)

3.3.3 สารเคมี

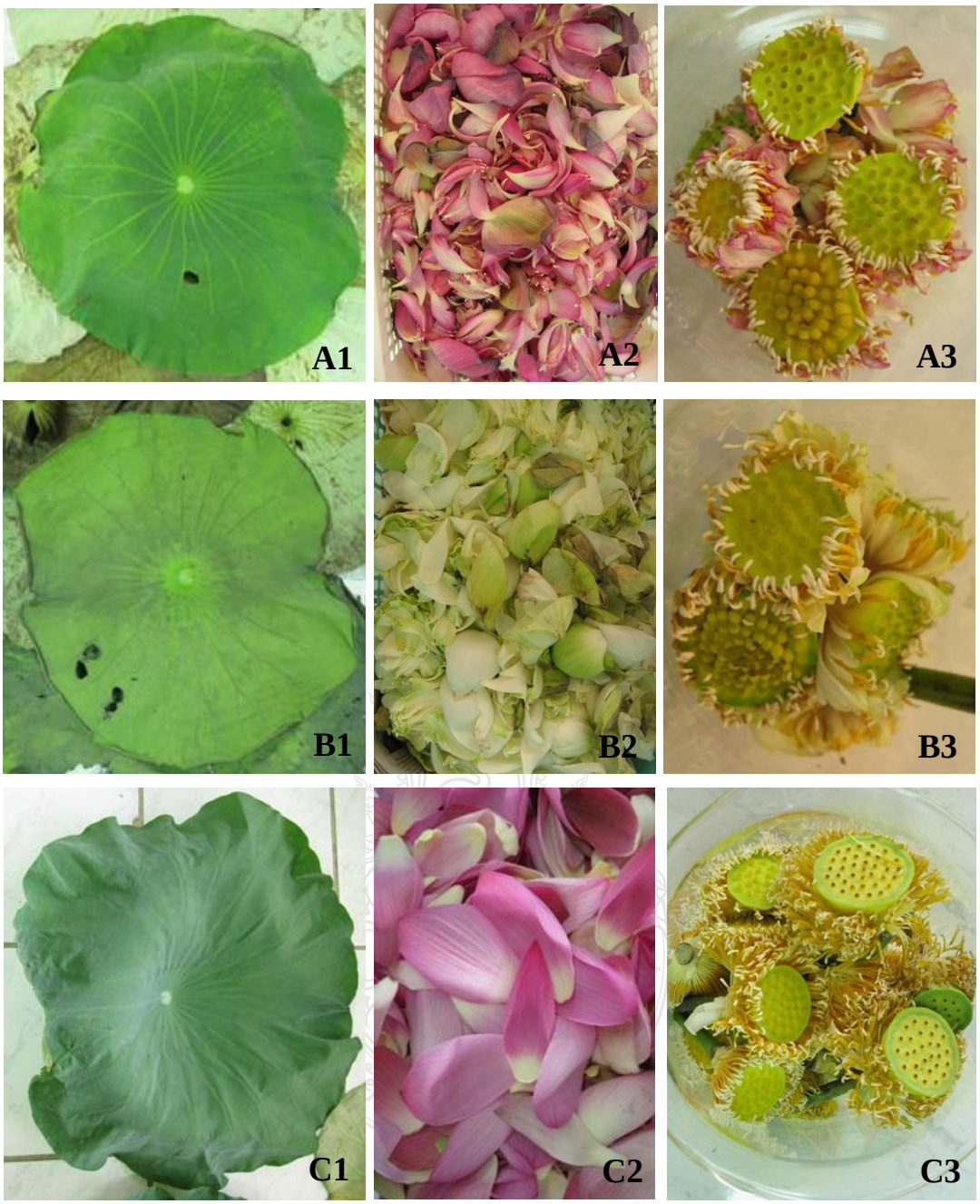
- Ethanol
-Amphotericin B

วิธีการ

1. การสกัดสารจากบัว

นำบัวที่เก็บมาจำนวน 6 ตัวอย่าง แยกบัวแต่ละพันธุ์เป็น 3 ส่วน ประกอบด้วยส่วนใบ กลีบดอก และเกสร (ภาพที่ 10) นำไปตากในที่ร่มที่มีอากาศถ่ายเท เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 2-3 ซม. นำไปบดให้ละเอียดและชั่ง นำมาหมักเปียกด้วยเอทานอล และสกัดเย็น (Cold extraction) ด้วยการแช่ด้วยตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากเป็นวิธีง่าย สะดวก และทำให้สารเกิดการเสื่อมสลายน้อย โดยนำพืชที่จะทำการสกัดใส่ในถุงผ้าดิบและเริ่มต้นการสกัดด้วยการแช่ในเอทานอล โดยใช้พืชแห้ง 200 กรัม ต่อตัวทำละลาย 3 ลิตร แช่ในตัวทำละลายนาน 7 วัน และทำการหมักซ้ำอีก 2 ครั้ง จนไม่มีสารออกมาจากตัวอย่างบัว นำส่วนที่เป็นของเหลวที่ได้จากการหมักไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสูญญากาศ (Rotary evaporator) จนได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) จากใบ กลีบดอก และเกสร ที่มีลักษณะข้นเหนียว (ภาพที่ 11) จากนั้นแยกสารสกัดด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีด้วยตัวทำละลายคือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอาซิเตท และเอทานอล ตามลำดับ ใช้เทคนิค TLC เพื่อดูรูปแบบของสารสกัดที่ได้ในตัวทำละลายต่างๆ และรวม Fraction ที่มีรูปแบบเหมือนกันไว้ด้วยกัน นำสารสกัดที่ได้นี้ไปใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี



ภาพที่ 10 ใบ กลีบดอก และเกสร ของบัวที่นำมาสกัดสาร

A1-3. ดอกบัวหลวงสัตตบงกช

B1-3. ดอกบัวหลวงสัตตบุตย์

C1-3. ดอกบัวหลวงปทุม

ภาพที่ 10 (ต่อ) ใบ กลีบดอก และเกสร ของบัวที่นำมาสกัดสาร

D1-3. ดอกบัวสายมะเหมี่ยว

E1-3. ดอกบัวสายขาวมงคล

F1-3. ดอกบัวสายฉลองขวัญ

ภาพที่ 11 ขั้นตอนการสกัดสารจากบัว

A, B. ใบ และกลีบดอกที่แห้ง

C. ใส่พืชที่แห้งในถุงผ้าดิบ

D. การหมักเปียกด้วยเอทานอล

E. เครื่องกลั่นระเหยสูญญากาศ (Rotary evaporator)

F. สารสกัดหยาบ (Crude extract)

2. วิธีแยกสารด้วยเทคนิค Column Chromatography

2.1 เตรียม Column Chromatography ใช้ Silica gel G_{60} เป็นตัวดูดซับผสมกับ Hexane แล้วผ่านลงใน Column โดยใช้อัตราส่วน สาร: Silica gel เท่ากับ 1:10 โดยใช้ Hexane เป็นตัวชะโดยให้ระดับของ Silica gel เรียบสม่ำเสมอ จากนั้นผ่าน Hexane ลงใน Column ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (Column ขนาดไดมิเตอร์ 1.3 เซนติเมตร) และ 100 มิลลิลิตร (Column ขนาดไดมิเตอร์ 3.0 เซนติเมตร) เวลาปล่อย Hexane ให้เหลือ Hexane อยู่เหนือ Silica gel เล็กน้อยเพื่อไม่ให้ Silica gel แห้งและแตก

2.2 นำสารสกัดผสมกับSilica gel โดยบดตัวอย่างให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ค่อยๆเติมสารที่บดไว้ลงใน Column

2.3 สารละลายสำหรับชะโดยใช้ Hexane : Dichloromethane, Dichloromethane: Ethyl acetate, Ethyl acetate : Ethanol , Ethanol : Methanol และ Methanol 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยปรับเปลี่ยนอัตราส่วนแต่ละครั้งจะเก็บ Fraction ครั้งละ 10 มิลลิลิตร(Column ขนาดไดมิเตอร์ 1.3 เซนติเมตร) และ 50 มิลลิลิตร (Column ขนาดไดมิเตอร์ 3.0 เซนติเมตร) ใส่ขวดเก็บสารซึ่งสารที่อยู่ใน column จะมีการแยกออกมาทำ TLC เพื่อตรวจสารและรวม Fraction ที่มีเหมือนกันไว้ด้วยกัน

2.4 นำสารที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกันมาแยกด้วย Column Chromatography อีกครั้ง โดยเตรียม Column Chromatography ใช้ Silica gel G_{60} เหมือนขั้นตอนที่ 2.1

3. การทดสอบหากลุ่มสารสำคัญในสารสกัด

สารสำคัญในสารสกัด ได้แก่ สารในกลุ่ม alkaloids, tannins, terpenoids, steroids, flavonoids, antraquinones และ cardiac glycosides เป็นต้นโดยนำวิธีของ Farnsworth *et al*., 1966; อ้อมบุญ, 2536; ถนอมศรี, 2523; นันทวัน, 2523 และ พรรนิภา, 2523 มาปรับใช้ในการทดสอบหากลุ่มสารสำคัญ ดังนี้

1. Alkaloids สารสกัด EtOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 5% HCl 20 ml อุ่น 15 นาที กรอง ทดสอบกับ Dragendorff's test, Mayer's test, Wanger's test, และ Kruat' s test

2. Tannins และ phenolic compounds สารสกัด EtOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายในน้ำ 20 ml อุ่น 15 นาที กรอง ถ้าขุ่นหยด 4-5 หยด 10% NaCl กรอง นำมาทดสอบกับ gelatin solution, gelatin salt solution, 1% $FeCl_3$, Br_2 water, Vanilin, 40% Formalin / HCL, และ Lime water

3. Triterpenes และ Steroids สารสกัด EtOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายด้วย $CHCl_3$ 1-2 ml นำมาทดสอบวิธี Liebermann Burchard test โดย หยด Acetic anhydride 3 หยด จากนั้นค่อยๆ หยด conc.H_2SO_4 ลงในหลอดทดลอง สังเกตวงแหวนที่เกิดขึ้นและเขย่าดูสีที่เกิดขึ้น

4. Flavonoids สารสกัด EtOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน Petoleum ether 4 ml กรองแล้วเอา residue ละลายใน 80 % ethanol 8 ml นำมาทดสอบ Cyadinin test โดยนำลวด Mg มาใส่ในหลอดทดลอง 3-4 ชิ้น แล้วค่อยหยด conc. HCl 3 หยด สังเกตฟองที่เกิด ทิ้งไว้ให้ละลายจนหมด จากนั้น เติมน้ำ 1 ml และ Octyl alcohol 1 ml สังเกตสีในชั้นของ Octyl alcohol

5. Antraquinones สารสกัด EtOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 0.5 M KOH จำนวน 10 ml แล้วเติม 3% H_2O_2 1 ml ต้มบนหม้ออังไอน้ำ 10 นาที กรอง ทิ้งให้เย็น หยด CH_3COOH จนเป็นกรด สกัดด้วย C_6H_6 10 ml นำมาทดสอบ Modified Borntragers test โดยนำชั้นของ C_6H_6 ไปหยด NH_3 จำนวน 1-2 หยด ตั้งทิ้งไว้

6. Cardiac glycosides สารสกัด EtOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 10% Lead acetate 10 ml อุ่น 15 นาที ทิ้งให้เย็น กรอง สกัดด้วย $CHCl_3$ 5 ml จำนวน 3 ครั้ง นำมาทดสอบวิธี Liebermann burchard test โดย หยด Acetic anhydride 3 หยด จากนั้นค่อยๆ หยด conc.H_2SO_4 จำนวน 1-2 หยด ลงใน หลอดทดลอง สังเกตสีที่เกิดขึ้นและเขย่าดูสีที่เกิดขึ้น

การทดสอบกลุ่มสาร Flavonoids (Screening for Flavonoids (Shinoda test) และการทดสอบหมู่ฟังก์ชัน

1. สารเคมี ได้แก่ Petroleum ether, Conc. Hydrochloric acid, 80% Ethanol, ลวด Mg และ $Br_2/CHCl_3$

2. วิธีการทดสอบกลุ่มสาร Flavonoids

- นำสารสกัดหยาบใส่หลอดทดลองปริมาณ 3 mg เติม Petroleum ether จนกว่าสารไม่มีสี จากนั้นเติม 80% Ethanol เพื่อทำการสกัดอีกครั้ง แล้วแยกส่วนสารละลาย Ethanol ออก จะได้ส่วนที่เป็นสารสกัดหยาบ

- นำลวด Mg 2-3 ชิ้นเล็กๆ ใส่ลงไปในหลอดที่มีสารสกัดหยาบที่ได้จากขั้นตอนข้างต้น เติม Conc. Hydrochloric 2-3 หยด สังเกตจากฟองแก๊สที่เกิดขึ้น ถ้าได้สีส้มแสดงว่าสารสกัดนั้นมีสารกลุ่ม Flavonoid เป็นองค์ประกอบ

3. วิธีการทดสอบหมู่ฟังก์ชัน (หมู่ฟังก์ชันไม่อิ่มตัว)

นำสารละลายตัวอย่าง 2 หยดใส่หลอดทดลอง หยดสารละลาย $Br_2/CHCl_3$ ค่อยๆหยดสารทีละหยดพร้อมเขย่า สังเกตสีของสารละลายจางลง

4. วิธีการทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH

1. เตรียม Stock Solution DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เข้มข้น 0.01 M 50 มิลลิลิตร

2. เตรียม DPPH เข้มข้น 0.0001 M โดยปิเปตจาก Stock Solution 2.5 มิลลิลิตรปรับปริมาตรด้วย Ethanol 250 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask

3. เตรียม Vitamin E หนัก 5 mg ปรับปริมาตรด้วย DPPH 0.0001 M 10 ml

4. เตรียมสารตัวอย่าง ชั่งสารตัวอย่าง 5 mg ปรับปริมาตรด้วย DPPH 0.0001 M 10 ml

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectroscopy ที่ 517 nm ของตัวอย่างเทียบกับ Vitamin E

6. คิดเปอร์เซ็นต์การยับยั้งด้วยสมการ

$$\% \text{ การยับยั้ง} = \frac{(Abs_{DPPH} - Abs_{sample})x100}{Abs_{DPPH}}$$

5. การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัด

5.1 เชื้อแบคทีเรีย

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมอาหารแข็ง โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient Agar (NA) 14 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร บรรจุใส่ขวดปิดฝา

2. เตรียมอาหารเหลว โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient Broth (NB) 6.5 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปิเปตอาหารเหลว (NB) ใส่หลอดทดลอง ปริมาตร 9 ml และปิดปากหลอดทดลองด้วยฝาจุกให้เรียบร้อย

3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมทั้งหมด (NA และ NB) เข้าเครื่อง autoclave เพื่อทำการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อน ที่อุณหภูมิ 121 ^{0}C ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

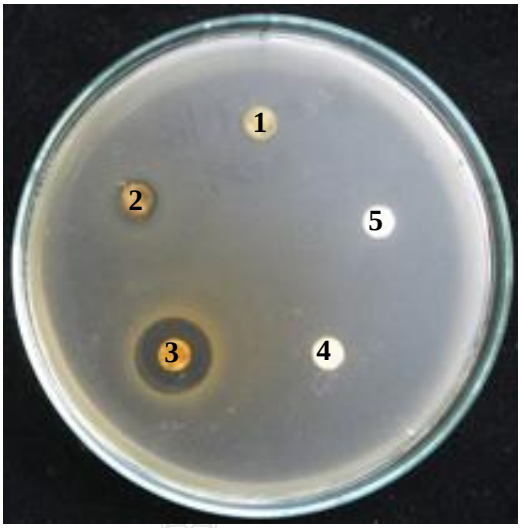
การเตรียมเชื้อเริ่มต้นสำหรับใช้ในการทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรีย 1 ลูป (loop) ใส่ในขวดรูปชมพู่ (flask) ที่มีอาหาร Nutrient Broth (NB) 15 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. ปิเปตเชื้อหลังจากบ่มแล้ว 5 ml ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 100 ml นำไปบ่มพร้อมเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. และหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยปิเปตเชื้อที่ได้ 1 ml ใส่ในอาหาร NB 9 ml เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) ได้สารละลายเจือจาง (Dilution 10^{-1}) จากนั้นนำเชื้อ Dilution 10^{-1} 1 ml ใส่ในอาหาร NB 9 ml เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารได้สารละลายเจือจาง (Dilution 10^{-2}) ทำการเจือจางเชื้อจนถึง 10^{-6} หรือ 10^{-7} ใช้เชื้อที่ Dilution 10^{-5} 1 ml ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ เททับด้วยอาหาร NA วนจานเลี้ยงเชื้อไปมาเบาๆ เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อผสมเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว แล้วนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชม.โดยทำ 2 ซ้ำ และเลี้ยงเชื้อที่ Dilution 10^{-6}และ Dilution 10^{-7} เช่นเดียวกัน ตรวจนับปริมาณเชื้อที่เกิดขึ้นเมื่อบ่มครบตามกำหนด โดยปริมาณเชื้อที่สามารถนับได้ควรอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี และคำนวณปริมาณเชื้อเริ่มต้นจากจำนวนเชื้อที่นับได้คูณด้วยค่าความเจือจางของเชื้อ

วิธีการทดสอบการยับยั้งเชื้อ

ในการทดสอบควรใช้เชื้อแบคทีเรียปริมาณ 10^5 - 10^6 CFU ml^{-1} โดยใช้เชื้อ 1 ml ต่ออาหาร NA 20 ml ใส่ใน 1 จานเลี้ยงเชื้อ เริ่มจากการนำเชื้อที่ได้เตรียมไว้ใส่ในอาหาร NA ที่หลอมละลายอุณหภูมิประมาณ 55°C โดยใช้เชื้อ 1 ml ต่อ อาหาร NA 20 ml เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อผสมอยู่ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ (ปริมาตรอาหารประมาณ 20 ml ต่อจาน) ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว แล้วจึงนำแผ่นดิสค์ (กระดาษกรองขนาด 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) หยดสารสกัดที่ต้องการทดสอบความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อดิสค์ และปล่อยให้แห้ง นำมาวางลงบนอาหารที่เตรียมไว้ ตามตำแหน่งต่างๆ (ภาพที่ 12) ทำ 3 ซ้ำ นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

ตรวจวัดขนาดบริเวณใสที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Clear zone, Inhibition zone) ที่เกิดขึ้นรอบแผ่นดิสค์



ภาพที่ 12 ตัวอย่างตำแหน่งการวางสารสกัด 4-2/H/DCM/E ทดสอบกับเชื้อ *B. subtilis*

จุดที่ 1 สารสกัดกลีบดอกบัวสายมะเหมี่ยวใน Hexane

จุดที่ 2 สารสกัดกลีบดอกบัวสายมะเหมี่ยวใน Dichloromethane

จุดที่ 3 สารสกัดกลีบดอกบัวสายมะเหมี่ยวใน Ethanol

จุดที่ 4 ตัวควบคุมที่ไม่ชุบสารสกัด

จุดที่ 5 ตัวควบคุมที่ชุบ Ethanol

5.2 เชื้อรา

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารแข็ง โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Potato Dextrose Agar (PDA) 39 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร บรรจุใส่ขวดปิดฝา และนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 ^{0}C ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

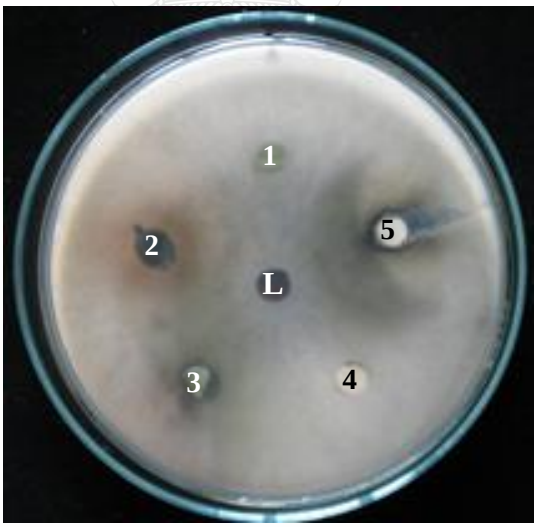
การเตรียมเชื้อรา

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเส้นใยเชื้อรามาเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อบนอาหารพีดีเอ ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อราเจริญเต็มที่จึงนำมาใช้ในการทดสอบ

วิธีการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา

การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดบัว ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี

Disc Diffusion method (Daru *et al.,* 2003) โดยเทอาหารพีดีเอปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซ็นติเมตร ผึ่งให้ผิวหน้าอาหารแห้งจึงนำมาใช้ในการทดสอบ นำสารสกัดบัวหยดลงบนแผ่นดิสค์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ความเข้มข้นของสารสกัด 2 มิลลิกรัมต่อดิสค์ รอจนแผ่นดิสค์แห้ง นำแผ่นดิสค์ไปวางบนผิวอาหารที่เตรียมไว้ โดยมีแผ่นดิสค์ที่ไม่ชุบสารสกัดเป็นตัวควบคุมลบ (negative control) และแผ่นดิสค์ที่หยด Amphotericin B ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อดิสค์ เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) เพื่อใช้เปรียบเทียบกับสารสกัดบัว จากนั้นใช้ cork borer เบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะกลุ่มเส้นใยบริเวณที่เชื้อกำลังมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วคือส่วนขอบโคโลนีของเชื้อราที่เตรียมไว้ วางชิ้นเส้นใยเชื้อตรงกลางจานที่มีแผ่นดิสค์ของสารสกัดวางอยู่ก่อน (ภาพที่ 13) พันรอบจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม ทำจำนวน 3 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น การวัดผลยับยั้งเชื้อราขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิด เนื่องจากเชื้อ *Sclerotium* spp. และ *Lasiodiplodia* sp. มีการเจริญอย่างรวดเร็ว การวัดขนาดบริเวณใสจะวัดในวันที่ 5 และ 3 ตามลำดับ โดยทำการทดสอบ 2 ครั้ง



ภาพที่ 13 ตัวอย่างตำแหน่งการวางสารสกัด 6-1/H/DCM/E ทดสอบกับเชื้อ *Lasiodiplodia* sp.(L)

จุดที่ 1 สารสกัดกลีบดอกบัวสายมะเหมี่ยวใน Hexane

จุดที่ 2 สารสกัดกลีบดอกบัวสายมะเหมี่ยวใน Dichloromethane

จุดที่ 3 สารสกัดกลีบดอกบัวสายมะเหมี่ยวใน Ethanol

จุดที่ 4 ตัวควบคุมลบ (Negative control) โดยใช้กระดาษกรองที่ไม่ชุบสารสกัด

จุดที่ 5 ตัวควบคุมบวก (Positive control) โดยใช้ Amphotericin B

5.3 การวิเคราะห์ผล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS (SPSS Statistics 17.0 for Windows) โดยการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของดันแคน (Duncan's new multiple range test, DMRT)

6. สถานที่ทำการทดลอง

ทำการทดลองที่คณะเทคโนโลยีการเกษตร และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

7. ระยะเวลาทำการวิจัย

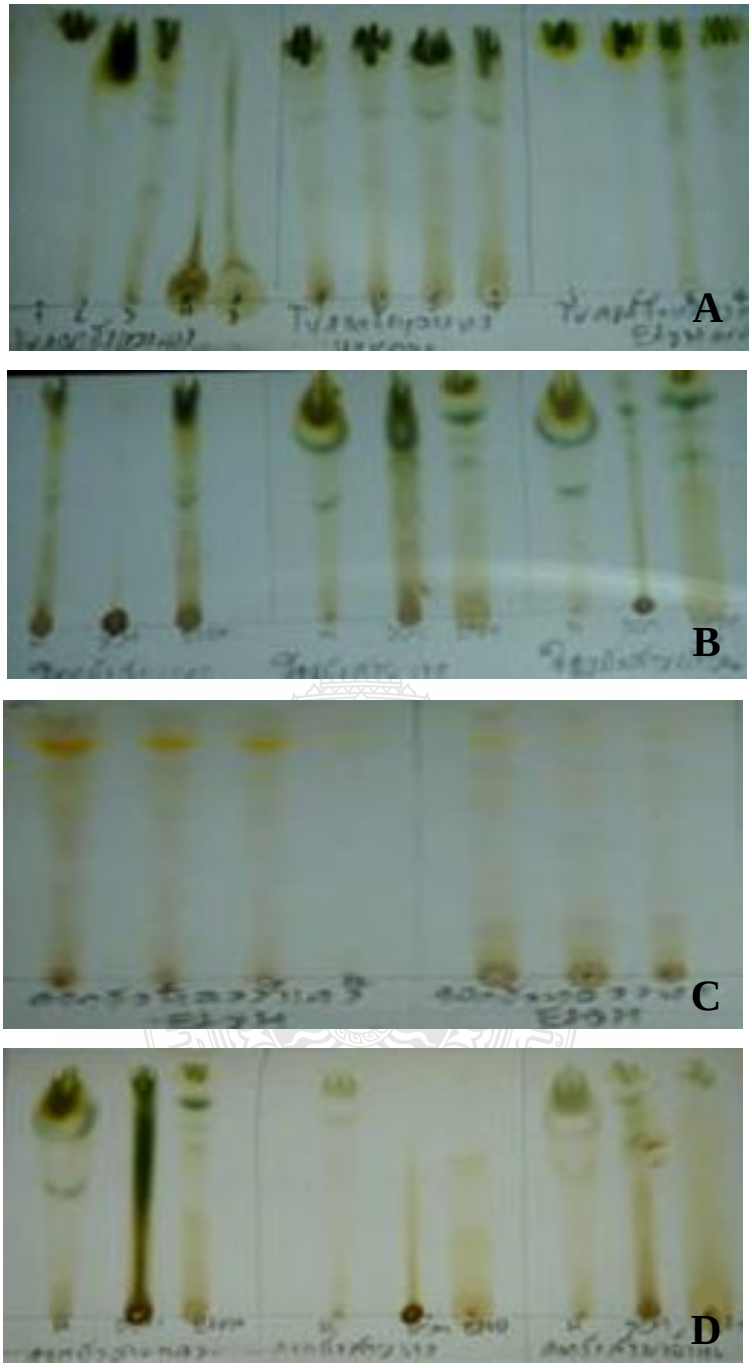
ระยะเวลาทำการวิจัยตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2551 ถึง 30 กันยายน 2553

ผลและวิจารณ์

1. การสกัดสารจากบัวหลวงและบัวสาย

เมื่อสกัดบัวด้วยตัวทำละลาย Ethanol ปริมาตร 3 ลิตร จำนวน 3 ครั้งได้สารสกัด Ethanol มีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวข้น (Crude extract) สีน้ำตาลเข้ม จากใบ กลีบดอก และเกสรของบัวทั้ง 6 ชนิด นำ Crude ที่มีปริมาณพอเพียงมาทำ Column Chromatography โดยใช้ Silica gel G_{60} เป็นตัวดูดซับผสมกับ Hexane แล้วผ่านลงใน Column โดยใช้อัตราส่วน สารสกัด: Silica gel อัตราส่วน 1:10 โดยใช้ Hexane เป็นตัวชะ โดยให้ระดับของ Silica gel เรียบสม่ำเสมอจากนั้นผ่าน Hexane ลงใน Column ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (Column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.3 เซนติเมตร) และ 100 มิลลิลิตร (Column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 เซนติเมตร) สารละลายสำหรับชะใช้ Hexane : Dichloromethane, Dichloromethane: Ethyl acetate, Ethyl acetate : Ethanol , Ethanol : Methanol และ Methanol 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยปรับเปลี่ยนอัตราส่วนแต่ละครั้งจะเก็บ Fraction ครั้งละ 10 มิลลิลิตร (Column ขนาด 1.3 เซนติเมตร) และ50 มิลลิลิตร (Column ขนาด 3.0 เซนติเมตร) ใส่ขวดเก็บสารที่แยกได้จาก Column chromatography ซึ่งสารที่ได้จาก Column chromatography นี้ใช้เทคนิค TLC เพื่อตรวจสารและรวม Fraction ที่มีเหมือนกันไว้ด้วยกัน (ภาพที่ 14) พบว่าสามารถรวม Fraction เป็นกลุ่มในตัวทำละลายนิดต่างๆ ได้ดังภาพที่ 15 เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี



ภาพที่ 14 รูปแบบ ส่วน (Fraction) ต่างๆ ของสารสกัดบัวที่ได้จากการแยกด้วย TLC

A. Fraction ของสารสกัดจากใบบัวหลวง

B. Fraction ของสารสกัดจากใบบัวสาย

C. Fraction ของสารสกัดจากกลีบดอกบัวหลวง

D. Fraction ของสารสกัดจากกลีบดอกบัวสาย

1-1A/H/F1-3

1-1A/H/F1= สารสกัดใบบัวหลวงสัตตบงกชในชั้นHexaneส่วนที่ 1-3

1-1A/H/F2= สารสกัดใบบัวหลวงสัตตบงกชในชั้นHexaneส่วนที่ 4-11

1-1A/H/F3= สารสกัดใบบัวหลวงสัตตบงกชในชั้นHexaneส่วนที่ 12-23

1-1B/H/F1-3

1-1B/H/F1= สารสกัดใบบัวหลวงสัตตบงกชในชั้นHexaneส่วนที่ 24-35

1-1B/H/F2= สารสกัดใบบัวหลวงสัตตบงกชในชั้นHexaneส่วนที่ 36-41

1-1B/H/F3= สารสกัดใบบัวหลวงสัตตบงกชในชั้นHexaneส่วนที่ 42-46

1-2/E-Crude

1-2/E/crude= สารสกัดหยาบดอกบัวหลวงสัตตบงกชในชั้นEthanol

1-3/E-Crude

1-3/E/crude= สารสกัดหยาบเกสรบัวหลวงสัตตบงกชในชั้นEthanol

ภาพที่ 15 สารสกัดที่ได้จากบัวหลวงสัตตบงกช

2-1A/H/F1-3

2-1A/H/F1= สารสกัดใบบัวหลวงสัตตบุตย์ในชั้นHexaneส่วนที่ 1

2-1A/H/F2= สารสกัดใบบัวหลวงสัตตบุตย์ในชั้นHexaneส่วนที่ 2-4

2-1A/H/F3= สารสกัดใบบัวหลวงสัตตบุตย์ในชั้นHexaneส่วนที่ 5-10

2-1B/H/F1-3

2-1B/H/F1= สารสกัดใบบัวหลวงสัตตบุตย์ในชั้นHexaneส่วนที่ 11-18

2-1B/H/F2= สารสกัดใบบัวหลวงสัตตบุตย์ในชั้นHexaneส่วนที่ 19-30

2-1B/H/F3= สารสกัดใบบัวหลวงสัตตบุตย์ในชั้นHexaneส่วนที่ 31-42

2-2/E/F1-4

2-2/E/F1= สารสกัดดอกบัวหลวงสัตตบุตย์ในชั้น Ethanol ส่วนที่ 1

2-2/E/F2= สารสกัดดอกบัวหลวงสัตตบุตย์ในชั้น Ethanol ส่วนที่ 2-3

2-2/E/F3= สารสกัดดอกบัวหลวงสัตตบุตย์ในชั้น Ethanol ส่วนที่ 4-6

2-2/E/F4= สารสกัดดอกบัวหลวงสัตตบุตย์ในชั้น Ethanol ส่วนที่ 7-10

ภาพที่ 15 (ต่อ) สารสกัดที่ได้จากบัวหลวงสัตตบุตย์

3-1/E/F1-4

3-1/E/F1= สารสกัดใบบัวหลวงปทุมในชั้น Ethanol ส่วนที่ 4

3-1/E/F2= สารสกัดใบบัวหลวงปทุมในชั้น Ethanol ส่วนที่ 9

3-1/E/F3= สารสกัดใบบัวหลวงปทุมในชั้น Ethanol ส่วนที่ 27

3-1/E/F4= สารสกัดใบบัวหลวงปทุมในชั้น Ethanol ส่วนที่ 37

3-2/E/F1-4

3-2/E/F1= สารสกัดดอกบัวหลวงปทุมในชั้น Ethanol ส่วนที่ 1-5

3-2/E/F2= สารสกัดดอกบัวหลวงปทุมในชั้น Ethanol ส่วนที่ 6-10

3-2/E/F3= สารสกัดดอกบัวหลวงปทุมในชั้น Ethanol ส่วนที่ 11-15

3-2/E/F4= สารสกัดดอกบัวหลวงปทุมในชั้น Ethanol ส่วนที่ 16-18

ภาพที่15 (ต่อ) สารสกัดที่ได้จากบัวหลวงปทุม

4-1/H/ DCM/E

4-1/H = สารสกัดใบบัวสายมะเหมี่ยวในชั้น Hexane

4-1/DCM = สารสกัดใบบัวสายมะเหมี่ยวในชั้น Dichloromethane

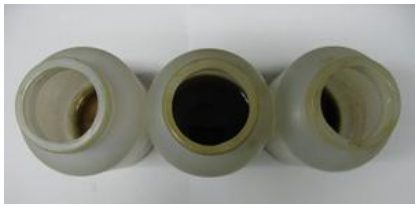
4-1/E = สารสกัดใบบัวสายมะเหมี่ยวในชั้น Ethanol

4-2/H/ DCM/E

4-2/H = สารสกัดดอกบัวสายมะเหมี่ยวในชั้น Hexane

4-2/DCM = สารสกัดดอกบัวสายมะเหมี่ยวในชั้น Dichloromethane

4-2/E = สารสกัดดอกบัวสายมะเหมี่ยวในชั้น Ethanol



4-3/H/ DCM/E

4-3/H = สารสกัดเกสรบัวสายมะเหมี่ยวในชั้น Hexane

4-3/DCM = สารสกัดเกสรบัวสายมะเหมี่ยวในชั้น Dichloromethane

4-3/E = สารสกัดเกสรบัวสายมะเหมี่ยวในชั้น Ethanol

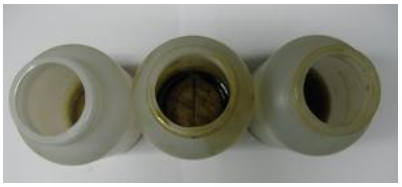
ภาพที่ 15 (ต่อ) สารสกัดที่ได้จากบัวสายมะเหมี่ยว

5-1/H/ DCM/E

5-1/H = สารสกัดใบบัวสายขาวมงคลในชั้น Hexane

5-1/DCM = สารสกัดใบบัวสายขาวมงคลในชั้น Dichloromethane

5-1/E = สารสกัดใบบัวสายขาวมงคลในชั้น Ethanol



5-2/H/ DCM/E

5-2/H = สารสกัดดอกบัวสายขาวมงคลในชั้น Hexane

5-2/DCM = สารสกัดดอกบัวสายขาวมงคลในชั้น Dichloromethane

5-2/E = สารสกัดดอกบัวสายขาวมงคลในชั้น Ethanol

ภาพที่ 15 (ต่อ) สารสกัดที่ได้จากบัวสายขาวมงคล

6-1/H/ DCM/E

6-1/H = สารสกัดใบบัวสายฉลองขวัญในชั้น Hexane

6-1/DCM = สารสกัดใบบัวสายฉลองขวัญในชั้น Dichloromethane

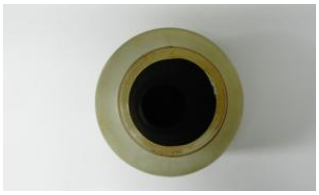
6-1/E = สารสกัดใบบัวสายฉลองขวัญในชั้น Ethanol

6-2/H/ DCM/E

6-2/H = สารสกัดดอกบัวสายฉลองขวัญในชั้น Hexane

6-2/DCM = สารสกัดดอกบัวสายฉลองขวัญในชั้น Dichloromethane

6-2/E = สารสกัดดอกบัวสายฉลองขวัญในชั้น Ethanol



6-3/E-Crude

6-3/E /crude= สารสกัดหยาบเกสรบัวสายฉลองขวัญในชั้นEthanol

ภาพที่ 15 (ต่อ) สารสกัดที่ได้จากบัวสายฉลองขวัญ

2. การทดสอบหากลุ่มสารสำคัญในสารสกัด

จากการแยกด้วยคอลัมภ์โครมาโทรกราฟี จากสารสกัดหยาบเฮกเซนพบว่ามี β-sitosterol ของใบบัว ดอกบัว และเกสรบัว ซึ่งส่วนมาก β-sitosterol มักพบในสารสกัดหยาบของเฮกเซน โดยนำสารที่ได้มาตกผลึกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดครอโรมีเทน-เอทานอล ได้ผลึกใสไม่มีสี มีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 134-136 องศาเซลเซียส และสารที่พบมากที่สุดจะเป็น Phenolic, Flavonoid และ Alkaloid (อ้อมบุญ, 2536) จากผลการทดลอง ในกลีบดอกบัวทั้ง 6 ชนิด พบสารกลุ่ม Flavonoids, Triterpenes, Steroids, Cardiac Glycosidesและ Antraquinones และส่วนใบพบสารกลุ่ม Alkaloids, Steroidsและ Cardiac Glycosides ดังตารางที่ 2 การทดลองในส่วนนี้ จะเป็นวิธีการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากบัวและใบบัวทั้ง 6 ชนิด โดยการใช้ปฏิกิริยาทางเคมีในการตรวจสอบสารสกัด ผลการทดสอบที่ได้อาจจะเป็น false positive หรือ false negative ได้ในบางกรณี แต่ก็ยังคงให้ข้อมูลองค์ประกอบพื้นฐานที่มีประโยชน์สำหรับตรวจสอบว่าในสารสกัดมีสารกลุ่มใดหรือมีโครงสร้างที่มีคุณสมบัติทางเคมีคล้ายสารกลุ่มใด เพื่อเป็นประโยชน์ในการทดลองวิจัยขั้นต่อไป

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบหากลุ่มสารสำคัญที่พบในสารสกัดจากใบและกลีบดอกบัว

พันธุ์บัว	% Crude EtOH	Alkaloids	Condensed Tannins	Other Phenolic Compounds	Flavonoids	Triterpenes	Steroids	Cardiac Glycosides	Antraquinones
ดอกบัวหลวงสัตตบงกช	2.4	-	-	√	√	√	√	√	√
ดอกบัวหลวงสัตตบุษย์	3.5	-	-		√	√	√	√	
ดอกบัวหลวงปทุม	2.5	-	-	√	√	√	√	√	√
ดอกบัวสายมะเหมี่ยว	7.8	-	-	-	√	√	√	-	√
ดอกบัวสายฉลองขวัญ	9.5	-	-	-	√	√	√	-	√
ดอกบัวสายขาวมงคล	6.5	-	-	-	√	√	√	-	-
ใบบัวหลวงสัตตบงกช	11.1	√	-	-		-	√	-	-
ใบบัวหลวงสัตตบุษย์	9.8	√	-	-		-	√	-	-
ใบบัวหลวงปทุม	7.8	√	-	-	-	-	√	√	-
ใบบัวหลวงปทุม	10.2	√	-	-	-	-	√	√	-
ใบบัวสายมะเหมี่ยว	11.3	√	-	-	-	-	√	√	-
ใบบัวสายขาวมงคล	9.7	√	-	-	-	-	√	√	-

3. การสกัด การทดสอบสารกลุ่ม Flavonoids และการทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

3.1 การสกัดสารกลุ่ม Flavonoids จากกลีบดอกบัวสาย โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย

กลีบดอกบัวสายฉลองขวัญ (สีน้ำเงิน) แห้ง 234.08 กรัม (ความชื้น 87% เทียบกับน้ำหนักสด) สกัดด้วยตัวทำละลาย Ethanol ปริมาตร 3 ลิตร จำนวน 3 ครั้งได้สารสกัด Ethanol มีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวข้น สีน้ำตาลเข้มหนัก 32.02 กรัมคิดเป็นปริมาณของสารที่แยกได้ (% yield) เท่ากับ 14% เทียบกับน้ำหนักกลีบดอกแห้ง สกัดแยกสารออกด้วย Dichloromethane จำนวน 3 ครั้ง ได้ Crude Dichloromethane หนัก 1.45 กรัมคิดเป็นปริมาณของสารที่แยกได้เท่ากับ 0.7% เทียบกับน้ำหนักกลีบดอกแห้ง นำส่วนสกัด Ethanol ที่เหลือจากการสกัดด้วย Dichloromethane มาสกัดต่อด้วย Ethyl acetate จำนวน 3 ครั้ง ได้ Crude Ethyl acetate หนัก 2.92 กรัมคิดเป็นปริมาณของสารที่แยกได้เท่ากับ 1% เทียบกับน้ำหนักกลีบดอกแห้งและได้ Crude Ethanol 27.00 กรัมคิดเป็นปริมาณของสารที่แยกได้เท่ากับ 11% เทียบกับน้ำหนักกลีบดอกแห้ง

กลีบดอกบัวสายมะเหมี่ยว (สีแดง) แห้ง 198.87 กรัม(ความชื้น 89% เทียบกับน้ำหนักสด) ทำการสกัดเช่นเดียว กับบัวสายสีน้ำเงินได้สารสกัด Ethanol มีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวข้น สีน้ำตาลเข้มหนัก 65.07 กรัมคิดเป็นปริมาณของสารที่แยกได้ (% yield) เท่ากับ 33% เทียบกับน้ำหนักกลีบดอกแห้ง ได้ Crude Dichloromethane หนัก 4.10 กรัมคิดเป็นปริมาณของสารที่แยกได้เท่ากับ 2% เทียบกับน้ำหนักกลีบดอกแห้ง ได้ Crude Ethyl acetate หนัก 24.53 กรัมคิดเป็นปริมาณของสารที่แยกได้เท่ากับ 12% เทียบกับน้ำหนักกลีบดอกแห้งและได้ Crude Ethanol 35.46 กรัมคิดเป็นปริมาณของสารที่แยกได้เท่ากับ 18% เทียบกับน้ำหนักกลีบดอกแห้ง (ตารางที่ 3)

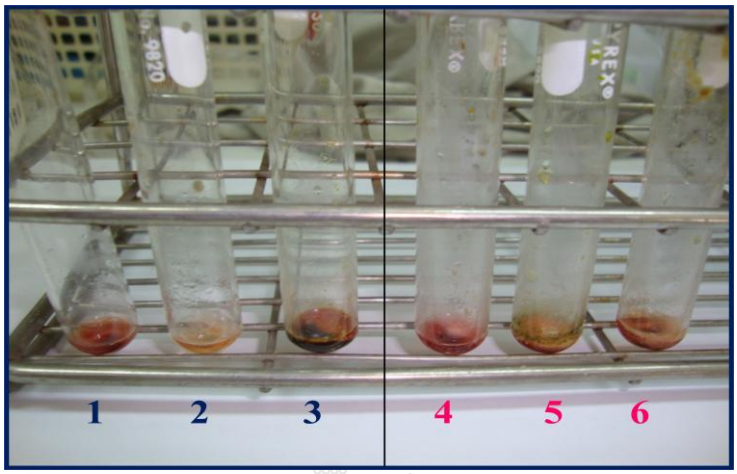
ตารางที่ 3 น้ำหนักและปริมาณของสารสกัดหยาบบัวสายที่แยกได้ (%yield) เปรียบเทียบกับน้ำหนักกลีบดอกแห้ง

Crude	บัวสายฉลองขวัญ		บัวสายมะเหมี่ยว	
	น้ำหนัก (g)	%yield	น้ำหนัก (g)	%yield
Dichloromethane	1.45	0.7	4.10	2
Ethyl acetate	2.92	1	24.53	12
Ethanol	27.00	11	35.46	18

3.2 ทดสอบกลุ่มสาร Flavonoids (Screening for Flavonoids (Shinoda test)) และทดสอบหมู่ฟังก์ชัน

จากผลการทดลองทั้งบัวสายฉลองขวัญ (สีน้ำเงิน) และบัวสายมะเหมี่ยว (สีแดง) พบสาร Flavonoids ทั้ง 6 Crude สังเกตได้จากสีของสารมีสีส้มถึงสีส้มแดง (ภาพที่ 15) เนื่องจากโครงสร้าง

สารกลุ่ม Flavonoids มีหมู่ฟังก์ชันไม่อิ่มตัวจึงนำ Crude ทั้งหมดที่พบ Flavonoids ตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันไม่อิ่มตัวด้วย $Br_2/CHCl_3$ ได้ผลดังตารางที่ 4



ภาพที่ 16 การทดสอบสารกลุ่ม Flavonoids ที่ให้ผลบวก (positive) ในสารสกัดจาก

1 บัวสายฉลองขวัญในรูปของ crude dichloromethane

2 บัวสายฉลองขวัญในรูปของ crude ethyl acetate

3 บัวสายฉลองขวัญในรูปของ crude ethanol

4 บัวสายมะเหมี่ยวในรูปของ crude dichloromethane

5 บัวสายมะเหมี่ยวในรูปของ crude ethyl acetate

6 บัวสายมะเหมี่ยวในรูปของ crude ethanol

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบหมู่ฟังก์ชันไม่อิ่มตัว

สารสกัด	**$Br_2/CHCl_3$**
บัวสายฉลองขวัญ crude dichloromethane	+
บัวสายฉลองขวัญ crude ethyl acetate	+
บัวสายฉลองขวัญ crude ethanol	+
บัวสายมะเหมี่ยว crude dichloromethane	+
บัวสายมะเหมี่ยว crude ethyl acetate	+
บัวสายมะเหมี่ยว crude ethanol	+

หมายเหตุ : + positive, - negative

3.3 การแยกสารโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

จากการทดสอบกลุ่มสาร Flavonoids พบว่า ทั้งบัวสายฉลองขวัญและบัวสายมะเหมี่ยว พบสารFlavonoids ทั้ง 6 Crude นำ Crude ทั้งหมดที่พบ Flavonoids มาทำ Column chromatography โดยใช้ Silica gel G_{60} เป็นตัวดูดซับผสมกับ Hexaneแล้วผ่าลงใน Column โดยใช้อัตราส่วน สาร: Silica gel 1:10 โดยใช้ Hexaneเป็นตัวชะโดยให้ระดับของ Silica gel เรียบสม่ำเสมอจากนั้นผ่าน Hexane ลงใน Column ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (Column ขนาดไดมิเตอร์ 1.3 เซนติเมตร) และ 100 มิลลิลิตร (Column ขนาดไดมิเตอร์ 3.0 เซนติเมตร)โดยน้ำหนัก Crude และ silica gel G_{60} แสดงได้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงน้ำหนัก crude และ silica gel G_{60} ที่ใช้ในColumn Chromatography

น้ำหนัก/ขนาด	บัวสายฉลองขวัญ			บัวสายมะเหมี่ยว		
	dichloromethane	**ethyl acetate**	**ethanol**	**dichloromethane**	**ethyl acetate**	**ethanol**
crude (g)	0.60	2.92	20.00	1.57	9.86	16.6
silica gel G_{60} (g)	6	30	200	16	100	170
Column diameter (cm.)	1.30	3.00	3.00	1.30	3.00	3.00

สารละลายสำหรับชะโดยใช้ Hexane : Dichloromethane, Dichloromethane: Ethyl acetate, Ethyl acetate : Ethanol , Ethanol : Methanol และ Methanol 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยปรับเปลี่ยนอัตราส่วนแต่ละครั้งจะเก็บ Fraction ครั้งละ 10 มิลลิลิตร(Column ขนาด 1.3 เซนติเมตร) และ50 มิลลิลิตร (Column ขนาด 3.0 เซนติเมตร) ใส่ขวดเก็บสารที่แยกได้จาก Column Chromatography มีจำนวน Fraction ที่ได้ทั้งหมดแสดงได้ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงจำนวน Fraction ทั้งหมดที่ได้จาก Column Chromatography

บัว	สารสกัด	จำนวน Fraction
บัวสายฉลองขวัญ	Dichloromethane	13
	Ethyl acetate	22
	Ethanol	22
บัวสายมะเหมี่ยว	Dichloromethane	13
	Ethyl acetate	26
	Ethanol	22

ซึ่งสารที่ได้จาก Column Chromatography จะมีการแยกออกมาทำ TLC เพื่อตรวจสารและรวม Fraction ที่มีเหมือนกันไว้ด้วยกัน(รูปที่ 16) พบว่าสามารถรวม Fraction เป็นกลุ่มได้ดังตารางที่ 7 และ ตารางที่ 8

ตารางที่ 7 แสดงการรวมกลุ่มสารที่ได้จาก Column Chromatographyในแต่ละ Fraction ด้วย TLC (บัวสายฉลองขวัญ)

สารสกัดบัวสายฉลองขวัญ	Fraction	กลุ่ม
Dichloromethane	1-6	B1*
	7-8	B2
	9-13	B3
Ethyl acetate	1-13	B4
	14-22	B5*
Ethanol	1-9	B6
	10-13	B7
	14-22	B8

หมายเหตุ : * กลุ่มสารที่ให้ผล positive กับ Shinoda test

ตารางที่ 8 แสดงการรวมกลุ่มสารที่ได้จาก Column chromatographyในแต่ละ Fraction ด้วย TLC (บัวสายมะเหมี่ยว)

สารสกัดบัวสายมะเหมี่ยว	Fraction	กลุ่ม
Dichloromethane	1-7	P1*
	8-13	P2
Ethyl acetate	1-6	P3*
	7-13	P4
	14-26	P5
Ethanol	1-7	P6
	8-16	P7
	17-22	P8

หมายเหตุ : * กลุ่มสารที่ให้ผล positive กับ Shinoda test

จากผลการทดลอง(ตารางที่ 7 และ 8) นำกลุ่มสารที่ได้มาทำการทดสอบ Screening for flavonoids (Shinoda test) พบว่า

- บัวสายฉลองขวัญชั้น Dichloromethane กลุ่ม B1 (Fraction 1-6) และชั้น Ethyl acetate กลุ่ม B5 (Fraction 14-22) พบสาร Flavonoids

- บัวสายมะเหมี่ยวชั้น Dichloromethane กลุ่ม P1 (Fraction 1-7) และชั้น Ethyl acetate กลุ่มที่ P3 (Fraction 1-6) พบสาร Flavonoids

3.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH

นำสารสกัดเฉพาะชั้น Dichloromethane และ Ethyl acetate Fraction 1-6 (B1), 14-22 (B1) และ 1-7 (P1), 1-6 (P3) ของกลีบดอกบัวสายฉลองขวัญและบัวสายมะเหมี่ยวเนื่องจากพบว่ามีกลุ่มสารสำคัญ คือ Flavonoid ที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดี มาทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH หาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยเทียบกับ Vitamin E วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่อง UV – Visible Spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 517 nm เป็นการวัดอนุมูล DPPH ที่เหลือ และนำค่า Absorbance ที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งดังผลการทดลองในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารตัวอย่างเทียบกับ Vitamin E

พันธุ์บัว	สาร (5 มิลลิกรัม)	การยับยั้ง (%)
บัวสายฉลองขวัญ	Dichloromethane (B1)	6
	Ethyl acetate (B5)	95
บัวสายมะเหมี่ยว	Dichloromethane (P1)	5
	Ethyl acetate (P3)	15
	Vitamin E	99

จากตารางที่ 9 พบว่าบัวสายฉลองขวัญและบัวสายมะเหมี่ยวชั้น Ethyl acetate มีฤทธิ์ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยบัวสายฉลองขวัญชั้น Ethyl acetate มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้ใกล้เคียงกับ Vitamin E คือ 95% และให้ผลการยับยั้งที่ดีกว่าบัวสายมะเหมี่ยวชั้น Ethyl acetate (15%) ดังนั้นบัวสายฉลองขวัญชั้น Ethyl acetate จึงมีฤทธิ์ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าบัวสายมะเหมี่ยวที่อยู่ในชั้นตัวทำละลายเดียวกัน

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบบัวโดยวิธี Disc Diffusion

สารสกัดบัว 6 ชนิด คือ บัวหลวงสัตตบงกช สัตตบุศย์ ปทุม และบัวสายมะเหมี่ยวขาวมงคล ฉลองขวัญ โดยสกัดจากส่วนใบ กลีบดอก และเกสร ได้สารสกัดหยาบบัวในชั้นเอทานอล จากนั้นนำสารสกัดหยาบบัวมาแยกส่วนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีได้สารสกัดบัวส่วนต่างๆ ที่อยู่ในชั้นตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ใช้เทคนิค TLC เพื่อตรวจสารและรวม Fraction ที่มีเหมือนกันไว้ด้วยกัน เมื่อนำแผ่นดิสท์ที่หยดสารสกัดดังกล่าวความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อแผ่นดิสท์ มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *B. subtilis, S. aureus* และ *E.coli* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5.2×10^{8}, 1.7×10^{8} และ 2.1×10^{8} CFU ml^{-1} ตามลำดับ และเชื้อรา 3 ชนิด คือ *Sclerotium* sp.7, *Sclerotium* sp.8 และ *Lasiodiplodia* sp. พบว่าสารสกัดจากบัว 6 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ดี โดยทำให้เกิดบริเวณใสดังแสดงในตารางที่ 10 และภาพที่ 16, 17 และ 18 แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ชนิด

สารสกัดจากใบบัวหลวงสัตตบงกช ในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนส่วนที่ B2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด คือ *B. subtilis, S. aureus* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสเท่ากับ 25 มิลลิเมตร

สารสกัดจากเกสรบัวสายมะเหมี่ยว ในชั้นของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสเท่ากับ 28 มิลลิเมตร

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) ของสารสกัดหยาบบัวในชั้นเอทานอล สารสกัดบัวส่วนต่างๆ ในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของดันแคน (Duncan's new multiple range test, DMRT) ดังตารางที่ 11 พบว่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* สารสกัดจากใบบัวหลวงสัตตบงกชในชั้นเฮกเซนส่วนที่ B2, ส่วนที่ B3 และสารสกัดจากใบบัวสายฉลองขวัญ ให้ผลการยับยั้งได้ดีที่สุด โดยมีขนาดบริเวณใสเท่ากับ 25, 24 และ 23 มิลลิเมตร ตามลำดับ รองลงมาเป็นสารสกัดจากกลีบดอกบัวหลวงสัตตบุศย์ในชั้นเอทานอลส่วนที่ 3 และสารสกัดจากใบบัวหลวงสัตตบงกชในชั้นเฮกเซนส่วนที่ B1 โดยมีขนาดบริเวณใสเท่ากับ 20 มิลลิเมตร

การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* สารสกัดจากใบบัวหลวงสัตตบงกชในชั้นเฮกเซนส่วนที่ B2 ให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด โดยมีขนาดบริเวณใสเท่ากับ 25 มิลลิเมตร รองลงมาเป็นสารสกัดจากใบบัวหลวงสัตตบงกชในชั้นเฮกเซนส่วนที่ B3 สารสกัดจากกลีบดอกบัวหลวงสัตตบุศย์ในชั้นเอทานอลส่วนที่ 3 และ 4 โดยมีขนาดบริเวณใสเท่ากับ 21, 18 และ18 มิลลิเมตร ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Li and Xu (2008) ที่พบว่าสาร Quercetin ในสารสกัดจากใบบัวมีฤทธิ์สามารถต้านทานเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบส่วนมากมีความต้านทานสูงกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Tomas-Barberan *et al*., 1988)

การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E.coli* สารสกัดจากเกสรบัวสายมะเหมี่ยวในชั้นไดคลอโรมีเทนให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด โดยมีขนาดบริเวณใสเท่ากับ 28 มิลลิเมตร รองลงมาเป็นเกสรบัวสายมะเหมี่ยวในชั้นเอทานอล ใบบัวสายฉลองขวัญในชั้นไดคลอโรมีเทน กลีบดอกบัวสายมะเหมี่ยวในชั้นไดคลอโรมีเทน ใบบัวสายมะเหมี่ยวในชั้นไดคลอโรมีเทน ใบบัวสายมะเหมี่ยวในชั้นเอทานอล และกลีบดอกบัวสายฉลองขวัญในชั้นเอทานอล โดยมีขนาดบริเวณใสเท่ากับ 23, 23, 22, 20, 19 และ19 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 10 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ของสารสกัดบัวด้วยวิธี Paper Disc Diffusion

พันธุ์บัว	สารสกัดในชั้นตัวทำละลายชนิดต่างๆ	ขนาดบริเวณใส (มิลลิเมตร)					
		B. subtilis	*S. aureus*	*E. coli*	*Sclerotium* sp.7	*Sclerotium* sp.8	*Lasiodiplodia*
1.บัวหลวงสัตตบงกช	1-1A/H/F1	-	4±0.38	7±0.06	-	-	-
	1-1A/H/ F2	7±0.06	4±0.35	7±0.06	-	-	-
	1-1A/H/ F3	2±0.40	-	7±0.06	-	-	-
	1-1B/H/ F1	20±0.06	9±0.20	8±0.06	-	-	-
	1-1B/H/ F2	25±0.20	25±0.62	10±0.10	-	-	-
	1-1B/H/ F3	24±0.35	21±0.06	7±0.10	-	-	-
	1-2/E-Crude	10±0.25	13±0.35	10±0.21	-	-	-
	1-3/E-Crude	3±0.52	-	6±0.06	-	-	-
2. บัวหลวงสัตตบุตย์	2-1A/H/ F1	-	-	6±0.06	-	-	-
	2-1A/H/ F2	-	4±0.35	6±0.06	-	-	-
	2-1A/H/ F3	13±0.35	1±0.26	8±0.06	-	-	-
	2-1B/H/ F1	10±0.23	4±0.38	7±0.10	-	-	-
	2-1B/H/ F2	11±0.21	6±0.00	8±0.06	-	-	-
	2-1B/H/ F3	15±0.42	13±0.55	9±0.00	-	-	-
	2-2/E/ F1	-	-	6±0.00	-	-	-
	2-2/E/ F2	16±0.44	13±0.21	12±0.26	-	-	-
	2-2/E/ F3	20±0.20	18±0.35	12±0.10	-	-	-
	2-2/E/ F4	17±0.15	18±0.15	12±0.06	-	-	-
3. บัวหลวงปทุม	3-1/E/ F1	-	-	7±0.00	-	-	-
	3-1/E/ F2	-	-	6±0.00	-	-	-
	3-1/E/ F3	-	2±0.35	6±0.00	-	-	-
	3-1/E/ F4	9±0.06	11±0.06	7±0.06	-	-	-
	3-2/E/ F1	11±0.15	11±0.26	6±0.06	-	-	-
	3-2/E/ F2	11±0.15	13±0.59	6±0.00	-	-	-
	3-2/E/ F3	11±0.06	11±0.12	6±0.06	-	-	-
	3-2/E/ F4	12±0.06	13±0.15	8±0.12	-	-	-

พันธุ์บัว	สารสกัดในชั้นตัวทำละลายชนิดต่างๆ	ขนาดบริเวณใส (มิลลิเมตร)					
		B. subtilis	*S. aureus*	*E. coli*	*Sclerotium* sp.7	*Sclerotium* sp.8	*Lasiodiplodia*
4. บัวสายมะเหมี่ยว	4-1/H	6±0.00	5±0.40	7±0.00	-	-	-
	4-1/DCM	18±0.21	8±0.12	20±0.46	-	-	-
	4-1/E	16±0.21	9±0.21	19±0.74	-	-	-
	4-2/H	-	-	10±0.44	-	-	-
	4-2/DCM	10±0.38	9±0.32	22±0.32	-	-	-
	4-2/E	16±0.46	9±0.35	23±0.82	-	-	-
	4-3/H	2±0.35	-	6±0.06	-	-	-
	4-3/DCM	13±0.21	1±0.21	28±0.15	-	-	-
	4-3/E	7±0.06	-	9±0.30	-	-	-
5. บัวสายขาวมงคล	5-1/H	7±0.00	7±0.10	7±0.06	-	-	-
	5-1/DCM	10±0.12	12±0.06	13±0.15	-	-	-
	5-1/E	14±0.15	9±0.17	18±0.35	-	-	-
	5-2/H	8±0.10	3±0.46	8±0.35	-	-	-
	5-2/DCM	9±0.15	9±0.21	7±0.06	-	-	-
	5-2/E	7±0.00	-	5±0.40	-	-	-
6.บัวสายฉลองขวัญ	6-1/H	6±0.06	4±0.38	7±0.06	-	-	-
	6-1/DCM	23±0.35	17±0.21	23±0.25	-	-	-
	6-1/E	11±0.23	14±0.42	15±0.20	-	-	-
	6-2/H	6±0.00	6±0.65	7±0.10	-	-	-
	6-2/DCM	7±0.00	6±0.00	5±0.44	-	-	-
	6-2/E	8±0.12	9±0.31	19±0.17	-	-	-
	6-3/E-Crude	12±0.31	1±0.20	16±0.51	-	-	-

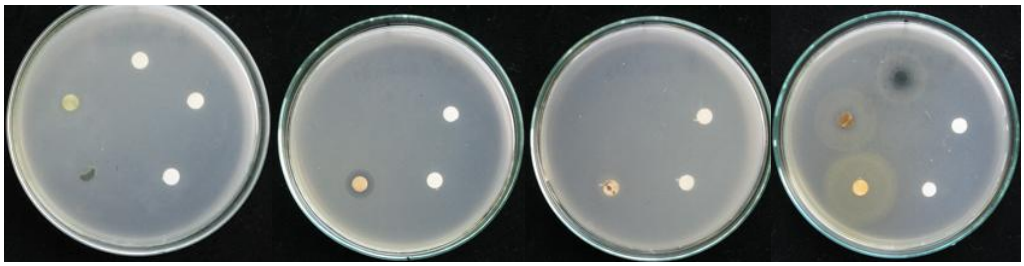
หมายเหตุ: - ไม่เกิดบริเวณใส

ตารางที่ 11 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ของสารสกัดบัวด้วยวิธี Paper Disc Diffusion

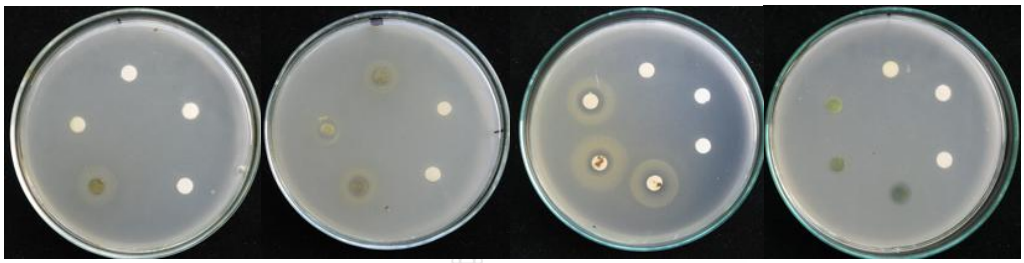
พันธุ์บัว	สารสกัดในชั้นตัวทำละลายชนิดต่างๆ	ขนาดบริเวณใส (มิลลิเมตร)					
		B. subtilis	*S. aureus*	*E. coli*	*Sclerotium* sp.7	*Sclerotium* sp.8	*Lasiodiplodia*
1.บัวหลวงสัตตบงกช	1-1A/H/F1	-	4^{klmn}	7^{ijk}	-	-	-
	1-1A/H/ F2	7^{klm}	4^{lmn}	7^{ijk}	-	-	-
	1-1A/H/ F3	2^{n}	-	7^{ijk}	-	-	-
	1-1B/H/ F1	20^{cd}	$9^{fghijklm}$	8^{hijk}	-	-	-
	1-1B/H/ F2	25^{a}	25^{a}	10^{ghij}	-	-	-
	1-1B/H/ F3	24^{ab}	21^{ab}	7^{hijk}	-	-	-
	1-2/E-Crude	10^{hijkl}	13^{cdefgh}	10^{ghijk}	-	-	-
	1-3/E-Crude	3^{mn}	-	6^{jk}	-	-	-
2. บัวหลวงสัตตบุตย์	2-1A/H/ F1	-	-	6^{jk}	-	-	-
	2-1A/H/ F2	-	4^{h}	6^{jk}	-	-	-
	2-1A/H/ F3	13^{efghi}	$1^{fghijklm}$	8^{hijk}	-	-	-
	2-1B/H/ F1	10^{hijkl}	4^{klmn}	7^{hijk}	-	-	-
	2-1B/H/ F2	11^{fghijk}	6^{ijklmn}	8^{hijk}	-	-	-
	2-1B/H/ F3	15^{efg}	13^{cdefg}	9^{ghijk}	-	-	-
	2-2/E/ F1	-	-	6^{jk}	-	-	-
	2-2/E/ F2	16^{def}	13^{cdefgh}	12^{fgh}	-	-	-
	2-2/E/ F3	20^{bcd}	18^{bc}	12^{fgh}	-	-	-
	2-2/E/ F4	17^{de}	18^{bcd}	12^{fghi}	-	-	-
3. บัวหลวงปทุม	3-1/E/ F1	-	-	7^{hijk}	-	-	-
	3-1/E/ F2	-	-	6^{jk}	-	-	-
	3-1/E/ F3	-	2^{n}	6^{jk}	-	-	-
	3-1/E/ F4	9^{hijkl}	$11^{efghijk}$	7^{ijk}	-	-	-
	3-2/E/ F1	11^{ghijkl}	11^{efghij}	6^{jk}	-	-	-
	3-2/E/ F2	11^{fghijk}	13^{cdefg}	6^{jk}	-	-	-
	3-2/E/ F3	11^{ghijkl}	11^{efghi}	6^{jk}	-	-	-
	3-2/E/ F4	12^{fghij}	13^{cdefgh}	8^{hijk}	-	-	-

พันธุ์บัว	สารสกัดในชั้นตัวทำละลายชนิดต่างๆ	ขนาดบริเวณใส (มิลลิเมตร)					
		B. subtilis	*S. aureus*	*E. coli*	*Sclerotium* sp.7	*Sclerotium* sp.8	*Lasiodiplodia*
4. บัวสายมะเหมี่ยว	4-1/H	6^{mn}	5^{jklmn}	7^{hijk}	-	-	-
	4-1/DCM	18^{del}	$8^{fghijklm}$	20^{bcd}	-	-	-
	4-1/E	16^{def}	$9^{fghijklm}$	19^{bcde}	-	-	-
	4-2/H	-	-	10^{ghij}	-	-	-
	4-2/DCM	10^{hijkl}	$9^{fghijkl}$	22^{bc}	-	-	-
	4-2/E	16^{def}	$9^{fghijklm}$	23^{b}	-	-	-
	4-3/H	2^{n}	-	6^{jk}	-	-	-
	4-3/DCM	13^{fghij}	$1^{fghijkl}$	28^{a}	-	-	-
	4-3/E	7^{klm}	-	9^{ghijk}	-	-	-
5. บัวสายขาวมงคล	5-1/H	7^{klm}	$7^{ghijklmn}$	7^{hijk}	-	-	-
	5-1/DCM	10^{ghijkl}	12^{defi}	13^{fg}	-	-	-
	5-1/E	14^{efgh}	$9^{fghijklm}$	18^{cde}	-	-	-
	5-2/H	8^{jkl}	3^{mn}	8^{hijk}	-	-	-
	5-2/DCM	9^{ijkl}	$9^{fghijklm}$	7^{hijk}	-	-	-
	5-2/E	7^{klm}	-	5^{k}	-	-	-
6.บัวสายฉลองขวัญ	6-1/H	6^{lmn}	4^{kmn}	7^{ik}	-	-	-
	6-1/DCM	23^{abc}	17^{bcde}	23^{b}	-	-	-
	6-1/E	11^{fghijk}	14^{cdef}	15^{ef}	-	-	-
	6-2/H	6^{klmn}	$6^{hijklmn}$	7^{hjk}	-	-	-
	6-2/DCM	7^{lm}	6^{ijklmn}	5^{jk}	-	-	-
	6-2/E	8^{jl}	$9^{fghijklm}$	19^{bcde}	-	-	-
	6-3/E-Crude	12^{fghij}	$1^{fghijkl}$	16^{def}	-	-	-

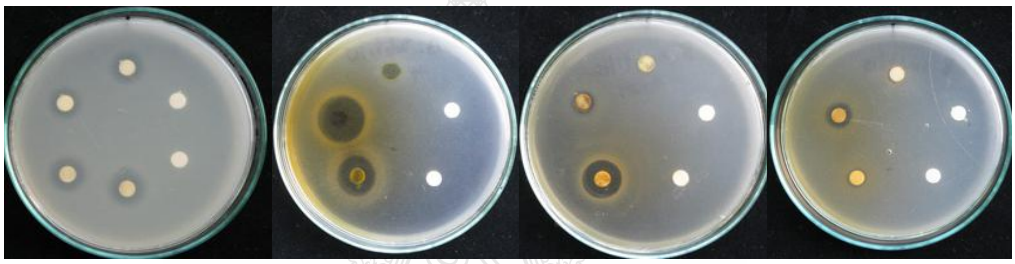
หมายเหตุ: อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



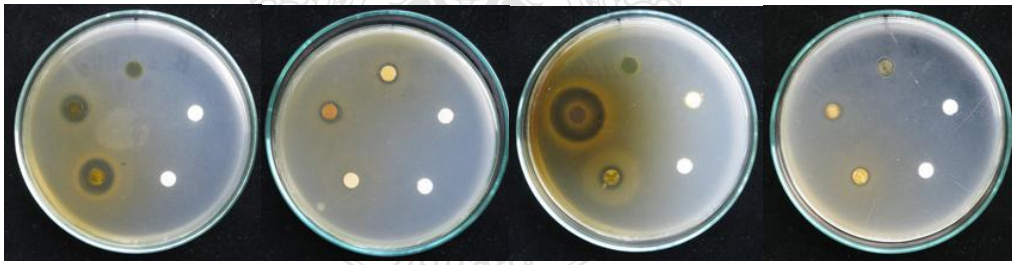
1-1A/H/F1-3 1-1B/H/F1-3 1-2/E-Crude 1-3/E-Crude



2-1A/H/F1-3 2-1B/H/F1-3 2-2/E/F1-4 3-1/E/F1-4



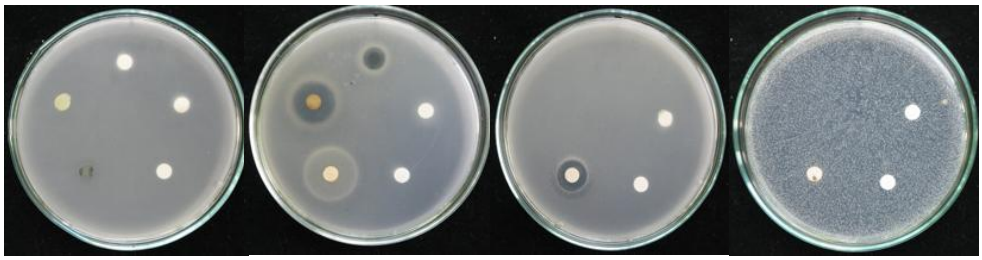
3-2/E/F1-4 4-1/H/DCM/E 4-2/H/DCM/E 4-3/H/DCM/E



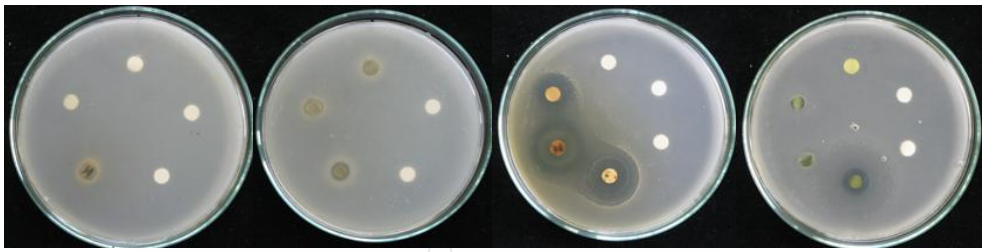
5-1/H/DCM/E 5-2/H/DCM/E 6-1/H/DCM/E 6-2/H/DCM/E

6-3/E-Crude

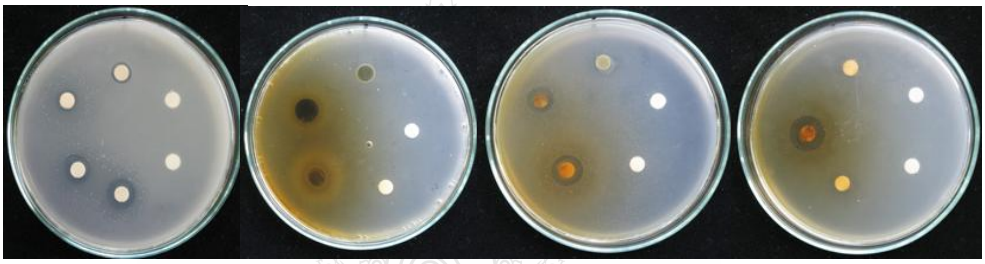
ภาพที่ 17 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ของสารสกัดบัวใน ตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยวิธี Paper Disc Diffusion



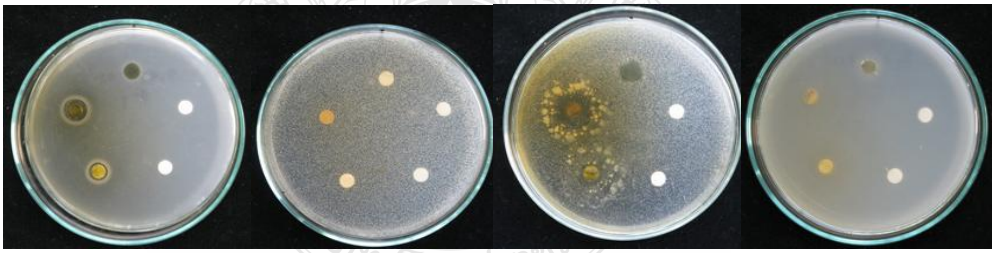
1-1A/H/F1-3 1-1B/H/F1-3 1-2/E-Crude 1-3/E-Crude



2-1A/H/F1-3 2-1B/H/F1-3 2-2/H/F1-4 3-1/E/F1-4



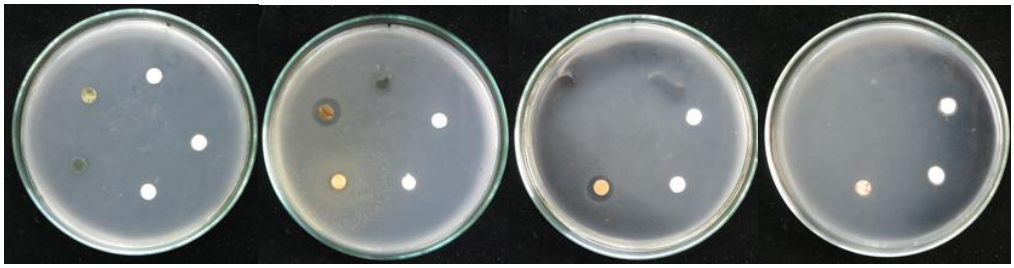
3-2/E/F1-4 4-1/H/DCM/E 4-2/H/DCM/E 4-3/H/DCM/E



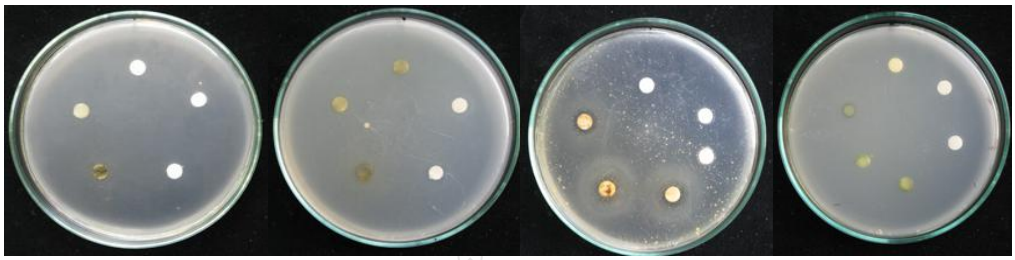
5-1/H/DCM/E 5-2/H/DCM/E 6-1/H/DCM/E 6-2/H/DCM/E

6-3/E-Crude

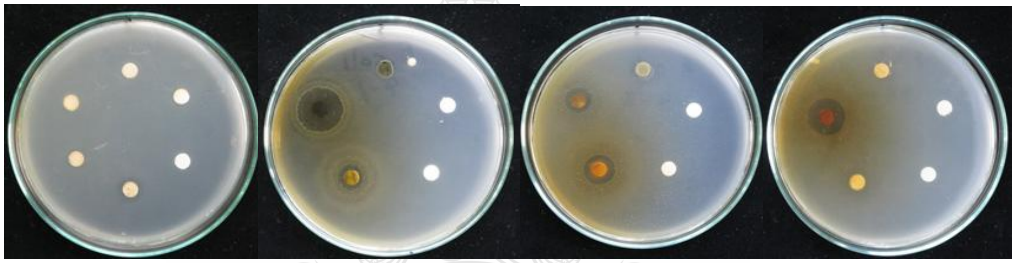
ภาพที่ 18 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดบัวในตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยวิธี Paper Disc Diffusion



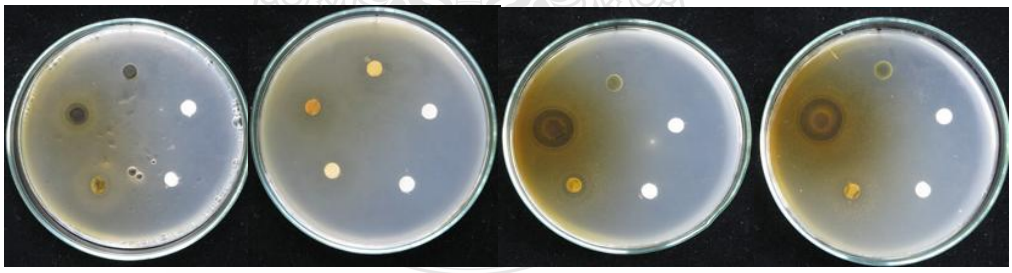
1-1A/H/F1-3 1-1B/H/F1-3 1-2/E-Crude 1-3/E-Crude



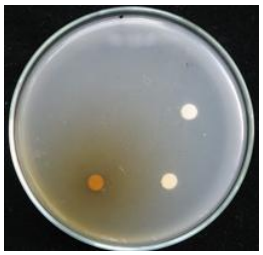
2-1A/H/F1-3 2-1B/H/F1-3 2-2/H/F1-4 3-1/E/F1-4



3-2/E/F1-4 4-1/H/DCM/E 4-2/H/DCM/E 4-3/H/DCM/E



5-1/H/DCM/E 5-2/H/DCM/E 6-1/H/DCM/E 6-2/H/DCM/E



6-3/E-Crude

ภาพที่ 19 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ของสารสกัดบัวในตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยวิธี Paper Disc Diffusion

สรุปผลการทดลอง

1. การสกัดสารจากบัวหลวงและบัวสายจำนวน 6 ชนิด จากส่วนใบ กลีบดอก และเกสร ได้สารสกัดในชั้นตัวทำละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน ethyl acetate และเอทานอล

การตรวจสอบทางพฤกษเคมีจากใบและกลีบดอกของบัวหลวงและบัวสาย กลุ่มสารสำคัญที่พบมากในใบ ได้แก่ Alkaloid และ Steroids สำหรับกลีบดอกกลุ่มสารสำคัญที่พบมาก ได้แก่ Flavonoid, Triterpenes และ Steroids

สารสกัดหยาบจากกลีบดอกบัวสายฉลองขวัญและมะเหมี่ยว เมื่อทดสอบด้วย Shinoda test พบ Flavonoids ในสารสกัดหยาบ 6 สาร จากการแยกสารกลุ่ม Flavonoids ด้วยเทคนิค Column Chromatography และ TLC สามารถรวม Fraction ของสารสกัดหยาบบัวสายฉลองขวัญและมะเหมี่ยวได้ ชนิดละ 8 กลุ่ม ตรวจสอบด้วย Shinoda test อีกครั้งพบสาร Flavonoids 4 กลุ่มในสารสกัดหยาบที่อยู่ในชั้น Dichloromethane และ Ethyl acetate

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สารกลุ่ม Flavonoids ในชั้น Ethyl acetate ของบัวสายฉลองขวัญและมะเหมี่ยว มีฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยบัวฉลองขวัญ (สีน้ำเงิน) ในชั้น Ethyl acetate มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันใกล้เคียงกับ Vitamin E คือมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 95% และมีฤทธิ์ดีกว่าบัวมะเหมี่ยว (สีแดง) ในชั้น Ethyl acetate ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 15% และจากการที่สารกลุ่ม Flavonoids เป็นสารประเภท antioxidant ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมในเวชภัณฑ์ทางด้าน ผิวพรรณ ความงาม จึงควรศึกษาต่อในการนำไปใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่างๆ

2. สารสกัดจากใบบัวหลวงสัตตบงกช ในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนส่วนที่ 2B เมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งด้วยวิธี Disc diffusion พบว่ายับยั้งเชื้อแบคทีเรีย คือ *B. subtilis, S. aureus* ได้ดีที่สุด มีขนาดบริเวณยับยั้ง 25 มิลลิเมตร ส่วนสารสกัดจากเกสรบัวสายมะเหมี่ยวในชั้นของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ได้ดีที่สุด มีขนาดบริเวณยับยั้ง 28 มิลลิเมตร โดยสารสกัดบัวทุกกลุ่มที่ทดสอบไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ชนิด

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. สถิติการส่งออกสินค้าเกษตร (ออนไลน์) 2553. (สืบค้น 8 กพ. 2553) เข้าถึงได้จาก: http://www.agriinfo.doae.go.th/5year/export/exportpage.pdf

กาญจนาและเอกชัย. 2552. ชีววิทยาของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp.SWU Sci. J.25 (2) : 120-134

ถนอมศรี วงศ์รัตนาสถิตย์. 2523. การตรวจหา Cardiac Glycosides. การสัมมนาเชิงปฏิบัติการพฤกษเคมี ครั้งที่ 2. เรื่อง Phytochemical Screening Techniques. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

นันทวัน บุณยะประภัศร. 2523. การตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อหาอัลคาลอยด์. การสัมมนาเชิงปฏิบัติการพฤกษเคมี ครั้งที่ 2. เรื่อง Phytochemical Screening Techniques. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

นานาการ์เด้นท์. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวหลวง (ออน์ไลน์) 2553. (สืบค้น 11 มค. 2553) เข้าถึงได้จาก: http://www.nanagarden.com

พรรนิภา ชุมศรี. 2523. การตรวจหา Anthraquinones, Tannins และ Polyphenols. การสัมมนาเชิงปฏิบัติการพฤกษเคมี ครั้งที่ 2 เรื่อง Phytochemical Screening Techniques. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

วันดี กฤษณพันธ์. 2536. เภสัชวินิจฉัยยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2546. ราวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม.

วีณา จิรัจฉริยากูล. 2534. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ.

เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล. 2551. ร้อยพรรณพฤกษา บัว. สำนักพิมพ์เศรษฐศิลป์ กรุงเทพฯ.

สถาบันการแพทย์แผนไทย กระทรวงสาธารณสุข. สารเคมีในพืชสมุนไพร (ออน์ไลน์) 2553. (สืบค้น 21 มค. 2553) เข้าถึงได้จาก: http://ittm.dtam.moph.go.th/data_all/herbs_index.html

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. บัวพืชมหัศจรรย์ (ออน์ไลน์) 2553. (สืบค้น 15 มีค. 2553) เข้าถึงได้จาก: http://www.kmitl.ac.th/agridata/Lotus/article/Lotus.pdf

เสริมลาภ วสุวัต. 2549. บัวประดับในประเทศไทย 2. เนชั่นบุ๊คส์.กรุงเทพฯ.

สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2540. พรรณไม้น้ำ. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ภาวะเศรษฐกิจการเกษตรปี 2552 และแนวโน้มปี 2553 (ออนไลน์) 2553. (สืบค้น 20 กพ. 2553) เข้าถึงได้จาก: http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php

อรอุมา ภู่ประเสริฐ. 2547. การประยุกต์ใช้นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ในการพิสูจน์โครงสร้างของอินทรียสาร. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม.

อ้อมบุญ ล้วนรัตน์. 2536. การสกัด และการตรวจสอบสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ.

Agnihotri, V.K., Elsohly,H.N., Khan, S.I.,Jacob, M.R.,Joshi,V.C.,Smillie,T., Khan, I.A., and Walker,L.A. 2008. Constituents of *Nelumbo nucifera* leaves and their antimalarial and antifungal activity.-hytochemical Letters1: 89-93

Daru, M. E.,Cakir, A.,Kordali,S., Zengin,H.,Harmandar, M., Isumi, S. and Hirata,T. 2003. Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three Pistacia species. Fitoterapia 74: 170-176.

Farnsworth, P., McNeman, O. and McNemar, Q. 1966. Book Reviews: Annual Review of Psychology (Volume 17). California. Annual Reviews Inc.

Hu, J-N., Shan, B., Deng, Z-Y., Li, J., Fan, Y-W., Ruan, Z., and Liu, R. 2010. Application of High-speed Counter-current Chromatography for the Isolation of 5 Alkaloids from Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) Leaves. Food Sci. Biotechnol. 19(6): 1661-1665.

Jorgensen, J.,Turnidge, J., and Washington, J. 1999. Antibacterial susceptibility tests: Dilution and disk diffusion methods. In Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A.,Tenover, F.C., Yolken, R.H.editors. Manual of clinical microbiology, 6th ed. Washington DC: ASM Press. P 1526-1543.

Jung, H.A., Kim, J.E.,Chung, H.Y., and Choi,J.S. 2003. Antioxidant Principles of *Nelumbo nucifera* Stamens. Arch Pharm Res 26(4): 279-285.

Liao, C-H., Guo, S-J., Lin, J-Y. 2011. Characterisation of the chemical composition and in vitro anti-inflammation assessment of a novel lotus (Nelumbo nucifera Gaertn) plumule polysaccharide Food Chemistry 125: 930–935.

Li, M. and Xu. Z. 2008. Quercetin in Lotus Leaves Extract may be responsible for antibacterial activity . Arch Pharm Res Vol. 31. No. 5: 640-644.

Phonkot, N., Wangsomnuk, P., and Aromdee, C. 2008. Antioxidant activity and DNA fingerprint of four varieties of lotus stamens (*Nelumbo nucifera* Gaertn.).Songklanakarin J Sci Technol 30 (1) : 55-58.

Pourmorad, F.,Hosseinimehr,S.J.,and Shahabimajd, N. 2006.Antioxidant activity,phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants.African Journal of Biotechnology.5(11): 1142-1145.

SPSS Statistics 17.0 for Windows. Chicago: SPSS Inc.

Tomas-Barberan, F. A., Msonthi, J.D. and Hostettman, N. K. 1988. Antifungal epicuticular methylated flavonoids from three Spanish Helichrysum species.Phytochemistry 27, 753-755.

Yang, D., Wang, Q.,Ke,L., Jiang,J. and Ying, T. 2007. Antioxidant activities of various extracts of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) rhizome.Asia Pac J Clin Nutr 16(suppl 1): 158-163.

ภาคผนวก

ตารางผนวก ก-1 ผลของสารสกัดบัวในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ต่อเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อทดสอบด้วยวิธี Paper Disc Diffusion

พันธุ์บัว	ส่วนของบัว	สารสกัดในตัวทำละลาย	ขนาดบริเวณใส (มิลลิเมตร)			
			1	2	3	เฉลี่ย
1.บัวหลวง สัตตบงกช	ใบ	1-1A/H/F1	-	-	-	-
		1-1A/H/ F2	7	7	8	7^{klm}
		1-1A/H/ F3	-	-	7	2^{n}
		1-1B/H/ F1	20	19	20	20^{cd}
		1-1B/H/ F2	23	25	27	25^{a}
		1-1B/H/ F3	22	22	28	24^{ab}
	กลีบดอก	1-2/E-Crude	7	10	12	10^{hijkl}
	เกสร	1-3/E-Crude	-	-	9	3^{mn}
2. บัวหลวง สัตตบุตย์	ใบ	2-1A/H/ F1	-	-	-	-
		2-1A/H/ F2	-	-	-	-
		2-1A/H/ F3	10	13	17	13^{efghi}
		2-1B/H/ F1	7	11	11	10^{hijkl}
		2-1B/H/ F2	13	12	9	11^{fghijk}
		2-1B/H/ F3	10	18	16	15^{efg}
	กลีบดอก	2-2/E/ F1	-	-	-	-
		2-2/E/ F2	11	18	19	16^{def}
		2-2/E/ F3	18	2	22	20^{bcd}
		2-2/E/ F4	1.7	1.6	1.9	17^{de}
3. บัวหลวง ปทุม	ใบ	3-1/E/ F1	-	-	-	-
		3-1/E/ F2	-	-	-	-
		3-1/E/ F3	-	-	-	-
		3-1/E/ F4	10	9	9	9^{hijkl}
	กลีบดอก	3-2/E/ F1	9	12	11	11^{ghijkl}
		3-2/E/ F2	11	13	10	11^{fghijk}
		3-2/E/ F3	10	11	11	11^{ghijkl}
		3-2/E/ F4	12	13	12	12^{fghij}

พันธุ์บัว	ส่วนของบัว	สารสกัดใน ตัวทำละลาย	ขนาดบริเวณใส (มิลลิเมตร)			
			1	2	3	เฉลี่ย
4. บัวสายมะเหมี่ยว	ใบ	4-1/H	6	6	6	6^{mn}
		4-1/DCM	20	16	17	18^{del}
		4-1/E	18	15	14	16^{def}
	กลีบดอก	4-2/H	-	-	-	-
		4-2/DCM	14	8	7	10^{hijkl}
		4-2/E	21	15	12	16^{def}
	เกสร	4-3/H	-	6	-	2^{n}
		4-3/DCM	15	11	12	13^{fghij}
		4-3/E	7	7	8	7^{klm}
5. บัวสายขาวมงคล	ใบ	5-1/H	7	7	7	7^{klm}
		5-1/DCM	11	9	11	10^{ghijkl}
		5-1/E	15	14	12	14^{efgh}
	กลีบดอก	5-2/H	8	9	7	8^{jkl}
		5-2/DCM	09	7	10	9^{ijkl}
		5-2/E	7	7	7	7^{klm}
6.บัวสายฉลองขวัญ	ใบ	6-1/H	6	7	6	6^{lmn}
		6-1/DCM	26	19	23	23^{abc}
		6-1/E	14	10	10	11^{fghijk}
	กลีบดอก	6-2/H	6	6	6	6^{klmn}
		6-2/DCM	7	7	7	7^{lm}
		6-2/E	9	9	7	8^{jl}
	เกสร	6-3/E-Crude	15	9	13	12^{fghij}

ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางผนวก ก-2 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของสารสกัดบัวต่อเชื้อ *Bacillus subtilis*

Source of Variation	d.f.	SS	MS	F
Treatment	39	3689.167	94.594	16.239*
Error	80	466.000	5.825	
Total	119	4155.167		

C.V.= 0.72 %

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ตารางผนวก ก-3 ผลของสารสกัดบัวในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ต่อเชื้อ *Staphylococus aureus* เมื่อทดสอบด้วยวิธี Paper Disc Diffusion

พันธุ์บัว	ส่วนของบัว	สารสกัดในตัวทำละลาย	ขนาดบริเวณใส (มิลลิเมตร)			
			1	2	3	เฉลี่ย
1.บัวหลวง สัตตบงกช	ใบ	1-1A/H/F1	-	7	6	4^{klmn}
		1-1A/H/ F2	-	6	6	4^{lmn}
		1-1A/H/ F3	-	-	-	-
		1-1B/H/ F1	9	11	7	$9^{fghijklm}$
		1-1B/H/ F2	18	30	27	25^{a}
		1-1B/H/ F3	21	21	22	21^{ab}
	กลีบดอก	1-2/E-Crude	16	9	13	13^{cdefgh}
	เกสร	1-3/E-Crude	-	-	-	-
2. บัวหลวง สัตตบุตย์	ใบ	2-1A/H/ F1	-	-	-	-
		2-1A/H/ F2	6	6	-	4^{h}
		2-1A/H/ F3	11	12	7	$1^{fghijklm}$
		2-1B/H/ F1	-	7	6	4^{klmn}
		2-1B/H/ F2	6	6	6	6^{ijklmn}
		2-1B/H/ F3	17	7	16	13^{cdefg}
	กลีบดอก	2-2/E/ F1	-	-	-	-
		2-2/E/ F2	15	12	11	13^{cdefgh}
		2-2/E/ F3	22	18	15	18^{bc}
		2-2/E/ F4	19	16	18	18^{bcd}
3. บัวหลวง ปทุม	ใบ	3-1/E/ F1	-	-	-	-
		3-1/E/ F2	-	-	-	-
		3-1/E/ F3	-	-	6	2^{n}
		3-1/E/ F4	11	10	11	$11^{efghijk}$
	กลีบดอก	3-2/E/ F1	14	9	10	11^{efghij}
		3-2/E/ F2	20	9	11	13^{cdefg}
		3-2/E/ F3	12	12	10	11^{efghi}
		3-2/E/ F4	14	13	11	13^{cdefgh}

พันธุ์บัว	ส่วนของบัว	สารสกัดใน ตัวทำละลาย	ขนาดบริเวณใส (มิลลิเมตร)			
			1	2	3	เฉลี่ย
4. บัวสายมะเหมี่ยว	ใบ	4-1/H	7	7	-	5^{jklmn}
		4-1/DCM	7	9	9	$8^{fghijklm}$
		4-1/E	7	8	11	$9^{fghijklm}$
	กลีบดอก	4-2/H	-	-	-	-
		4-2/DCM	13	7	8	$9^{fghijkl}$
		4-2/E	13	7	7	$9^{fghijklm}$
	เกสร	4-3/H	-	-	-	-
		4-3/DCM	9	8	12	$1^{fghijkl}$
		4-3/E	-	-	-	-
5. บัวสายขาวมงคล	ใบ	5-1/H	6	8	7	$7^{ghijklmn}$
		5-1/DCM	11	12	12	12^{defi}
		5-1/E	8	8	11	$9^{fghijklm}$
	กลีบดอก	5-2/H	-	-	8	3^{mn}
		5-2/DCM	7	11	8	$9^{fghijklm}$
		5-2/E	-	-	-	-
6.บัวสายฉลองขวัญ	ใบ	6-1/H	6	7	-	4^{kmn}
		6-1/DCM	15	19	16	17^{bcde}
		6-1/E	11	13	19	14^{cdef}
	กลีบดอก	6-2/H	-	13	6	$6^{hijklmn}$
		6-2/DCM	6	6	6	6^{ijklmn}
		6-2/E	12	6	8	$9^{fghijklm}$
	เกสร	6-3/E-Crude	8	10	12	$1^{fghijkl}$

ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางผนวก ก-4 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของสารสกัดบัวต่อเชื้อ

Staphylococus aureus

Source of Variation	d.f.	SS	MS	F
Treatment	37	2925.193	79.059	7.657*
Error	76	784.667	10.325	
Total	113	3709.860		

C.V.= 0.83 %

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ตารางผนวก ก-5 ผลของสารสกัดบัวในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ต่อเชื้อ *Escherichia coli* เมื่อทดสอบด้วยวิธี Paper Disc Diffusion

พันธุ์บัว	ส่วนของบัว	สารสกัดในตัวทำละลาย	ขนาดบริเวณใส (มิลลิเมตร)			
			1	2	3	เฉลี่ย
1.บัวหลวง สัตตบงกช	ใบ	1-1A/H/F1	7	6	7	7^{ijk}
		1-1A/H/ F2	7	7	6	7^{ijk}
		1-1A/H/ F3	7	7	6	7^{ijk}
		1-1B/H/ F1	9	8	8	8^{hijk}
		1-1B/H/ F2	11	9	10	10^{ghij}
		1-1B/H/ F3	8	6	7	7^{hijk}
	กลีบดอก	1-2/E-Crude	12	8	9	10^{ghijk}
	เกสร	1-3/E-Crude	7	6	6	6^{jk}
2. บัวหลวง สัตตบุตย์	ใบ	2-1A/H/ F1	6	7	6	6^{jk}
		2-1A/H/ F2	6	6	7	6^{jk}
		2-1A/H/ F3	8	8	9	8^{hijk}
		2-1B/H/ F1	8	7	6	7^{hijk}
		2-1B/H/ F2	9	8	8	8^{hijk}
		2-1B/H/ F3	9	9	9	9^{ghijk}
	กลีบดอก	2-2/E/ F1	6	6	6	6^{jk}
		2-2/E/ F2	10	11	15	12^{fgh}
		2-2/E/ F3	13	12	11	12^{fgh}
		2-2/E/ F4	12	12	11	12^{fghi}
3. บัวหลวง ปทุม	ใบ	3-1/E/ F1	7	7	7	7^{hijk}
		3-1/E/ F2	6	6	6	6^{jk}
		3-1/E/ F3	6	6	6	6^{jk}
		3-1/E/ F4	7	6	7	7^{ijk}
	กลีบดอก	3-2/E/ F1	7	6	6	6^{jk}
		3-2/E/ F2	6	6	6	6^{jk}
		3-2/E/ F3	7	6	6	6^{jk}
		3-2/E/ F4	7	7	9	8^{hijk}

พันธุ์บัว	ส่วนของบัว	สารสกัดในตัวทำละลาย	ขนาดบริเวณใส (มิลลิเมตร)			
			1	2	3	เฉลี่ย
4. บัวสายมะเหมี่ยว	ใบ	4-1/H	7	7	7	7^{hijk}
		4-1/DCM	25	17	17	20^{bcd}
		4-1/E	27	16	13	19^{bcde}
	กลีบดอก	4-2/H	15	8	7	10^{ghij}
		4-2/DCM	24	18	23	22^{bc}
		4-2/E	25	30	14	23^{b}
	เกสร	4-3/H	7	6	6	6^{jk}
		4-3/DCM	28	27	30	28^{a}
		4-3/E	6	12	9	9^{ghijk}
5. บัวสายขาวมงคล	ใบ	5-1/H	8	7	7	7^{hijk}
		5-1/DCM	13	15	12	13^{fg}
		5-1/E	22	16	16	18^{cde}
	กลีบดอก	5-2/H	12	6	6	8^{hijk}
		5-2/DCM	7	8	7	7^{hijk}
		5-2/E	7	7	-	5^{k}
6.บัวสายฉลองขวัญ	ใบ	6-1/H	7	7	6	7^{ik}
		6-1/DCM	20	23	25	23^{b}
		6-1/E	13	15	17	15^{ef}
	กลีบดอก	6-2/H	6	8	7	7^{hjk}
		6-2/DCM	-	8	7	5^{jk}
		6-2/E	20	17	20	19^{bcde}
	เกสร	6-3/E-Crude	20	17	10	16^{def}

ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางผนวก ก-6 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของสารสกัดบัวต่อเชื้อ *Escherichia coli*

Source of Variation	d.f.	SS	MS	F
Treatment	47	4569.326	97.220	15.151*
Error	96	616.000	6.417	
Total	143	5185.326		

C.V.= 0.59 %

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ภาคผนวก ข.
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

Nutrient Agar (NA)

Nutrient Agar (HIMEDIA, India) 28 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

Nutrient Broth (NB)

Nutrient Broth (HIMEDIA, India) 13 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato Dextrose Agar (HIMEDIA, India) 39 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

0.01 M DPPH Stock solution

สาร DPPH 0.1972 กรัม ปรับปริมาตรด้วย Absolute ethanol 50 มิลลิลิตร

0.0001 M DPPH

stock solution 2.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Absolute ethanol 250 มิลลิลิตร

50 % ethanol

95% ethanol ปริมาตร 53 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

$Br_2/CHCl_3$

Br_2 1 มิลลิลิตร ผสมกับ $CHCl_3$ 4 มิลลิลิตร