Ubon Rajathanee University

รายงานวิจัย
เรื่อง
น้ำมันหอมระเหยจากดอกกันเกรา

โดย

อารี วังมณีรัตน์
และ
สุดารัตน์ หอมหวล นิธิมา สุทธิพันธุ์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

พ.ศ. 2547

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
เงินหมวดอุดหนุนทั่วไป ปีงบประมาณ 2541
รหัสโครงงานวิจัย : 03008662-0001

ISBN 974-609-208-1

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

A Research Report

Floral Volatiles of *Fragrea fragrance* Roxb.

by

Aree Wangmaneerat

and

Sudarat Homhual Nitima Suttipanta

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Ubonratchathani University

2004

This research was financially supported from

The National Research Council of Thailand in Fiscal Year, 1998

Research Code : 03008662-0001

ISBN 974-609-208-1

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

รายงานการวิจัยเรื่องน้ำมันหอมระเหยจากดอกกันเกรา

Floral Volatiles of *Fragrea fragrance* Roxb.

ISBN 974-609-208-1

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ นายอารี วังมณีรัตน์ ภ.บ., M.Sc.(Pharmacognosy)

ผู้ร่วมโครงการ นางสุดารัตน์ หอมหวล ภ.บ., ภ.ม.(เภสัชเวท)

นางสาวนิธิมา สุทธิพันธุ์ ภ.บ., ภ.ม.(เภสัชเวท)

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โทรศัพท์ (045) 288 382-3

โทรสาร (045) 288 384

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

เงินหมวดอุดหนุนทั่วไป ปีงบประมาณ 2541 จำนวนเงิน 184,400 บาท

ระยะเวลาทำวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541-2542 รหัส โครงงานวิจัย : 03008662-0001

บทคัดย่อ

การศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกกันเกรา *(Fragrea fragrance* Roxb.) โดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ การใช้ไขร้อน การใช้ไขเย็นดูดซับ และ การสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ พบว่า วิธีที่เหมาะสมที่สามารถสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกกันเกราให้ได้กลิ่นคล้ายคลึงกับธรรมชาติมากที่สุดคือ การสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ โดยใช้ตัวทำละลาย Petroleum ether เป็นสารสกัด จากนั้นนำสารสกัดไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยวิธีแก๊สโครมาโทรกราฟฟี -แมสสเปกโทเมตตรี (GC-MS) พบว่า ในสารสกัด Hexane ประกอบด้วยสารเคมี 19 ชนิด และ ในสารสกัด Petroleum ether ประกอบด้วยสารเคมี 17 ชนิด ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดโดย TLC finger print นอกจากนี้ยังทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ พบว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

รายงานการวิจัยเรื่อง น้ำมันหอมระเหยจากดอกกันเกรา

Floral Volatiles of *Fragrea fragrance* Roxb.

ISBN 974-609-208-1

Researchers

Mr. Aree Wangmaneerat ; B.Sc. in Pharm, M.Sc. (Pharmacognosy)

Mrs. Sudarat Homhua ; B.Sc. in Pharm, M.Sc. (Pharmacognosy)

Miss Nitima Suttipanta ; B.Pharm , M.Pharm (Pharmacognosy)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubonratchathani University

Telephone : (045) 288 382-3

Fax : (045) 288 384

This research was financially supported from The National Research Council of Thailand in Fiscal Year, 1998 for – 184,400 Bath

Research duration 1 year from 1998-1999

Code of this research : 03008662-0001

Abstract

The floral volatiles of *Fragraea fragrance* Roxb. were isolated by steam distillation, hot fat extraction, enfeurage and solvent extraction. The most appropriate method was solvent extraction since the floral volatiles extracted by this method had smell like natural flower. The best organic solvent for extraction was petroleum ether and then petroleum ether extract as well as hexane extract was analyzed by GC/MS to identify the chemical constituents. Hexane extract composed of 19 organic components, while petroleum ether extract composed of 17 organic components. Both extracts were also separated on thin layer chromatography to determine their TLC finger prints. In addition, both extracts had antimicrobial activity to *Staphylococcus aureus*

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาคุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมี รวมทั้งฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากดอกกันเกรา โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ การดำเนินการวิจัยได้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี โดยได้รับคำชี้แนะด้านวิชาการจาก ร.ศ. ดร. บังอร ศรีพานิชกุลชัย และ ความช่วยเหลือในการทำปฏิบัติการจาก ภ.ก. กำชัย ลี้สุรพลานนท์ ภ.ญ. ชุติมา รัตนชมภู และ ภ.ญ. ประไพพิมพ์ รวมใหม่

คณะผู้วิจัยยังได้รับความเอื้อเฟื้อในการตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก รศ.ดร. วันชัย ดีเอกนามกูล คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้มีรายนามข้างต้น และหวังว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ ต่อผู้อ่านและผู้สนใจ ในการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกกันเกรา หากมีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้วิจัยใคร่ขออภัยไว้ ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	
ลักษณะอนุกรมวิธานของต้นกันเกรา	3
ประโยชน์จากต้นกันเกรา	5
สารเคมีในต้นกันเกรา	6
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
อุปกรณ์และสารเคมี	14
พืชที่ใช้ทดลอง	14
วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกกันเกรา	14
การทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจากดอกกันเกรา	17
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหย	19
ผลการตรวจสอบคุณสมบัติ Absolute ของ Hexane โดยวิธี GC-MS	20
ผลการตรวจสอบคุณสมบัติ Absolute ของ Petroleum ether โดยวิธี GC-MS	41
ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของ Absolute ของสารสกัดในวิธีต่างๆ โดยวิธี TLC	59
ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของ Absolute ของสารสกัดในวิธีต่างๆ ทางจุลชีววิทยา	65
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	
สรุปผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	66
บรรณานุกรม	72
ภาคผนวก ก	74
คณะผู้ดำเนินการวิจัย	77

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงสารประกอบในใบกันเกรา	6
ตารางที่ 2	แสดงวัฏภาคเคลื่อนที่ (Solvent System)	17
ตารางที่ 3	แสดงผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีต่างๆ	19
ตารางที่ 4	แสดงผลการตรวจสอบคุณสมบัติ Absolute ของสาร โดยวิธี GC-MS ในสาร Absolute จาก Hexane	20
ตารางที่ 5	แสดงผลการตรวจสอบคุณสมบัติ Absolute ของสาร โดยวิธี GC-MS ในสาร Absolute จาก Petroleum Ether	41
ตารางที่ 6	แสดงผลการตรวจสอบคุณสมบัติของ Absolute ของสารสกัดในวิธีต่างๆ โดยวิธี TLC	59
ตารางที่ 7	แสดงผลตรวจสอบความไวของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ต่อ Absolute ของสารสกัด โดยวิธี Disc Agar Diffusion Method	65
ตารางที่ 8	แสดงผลการตรวจสอบ Absolute โดย TLC ใช้ Eugenol เป็น Marker	70
ตารางที่ 9	แสดงผล Marker ชนิดอื่นใน TLC	70

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงภาพอนุกรมวิธานของดอกกันเกรา 4

รูปที่ 2 แสดงภาพ TLC ของ Absolute จากการตรวจสอบด้วยความยาวคลื่น UV 266 60

รูปที่ 3 แสดงภาพ TLC ของ Absolute จากการตรวจสอบด้วยความยาวคลื่น UV 325 62

รูปที่ 4 แสดงภาพ TLC ของ Absolute จากการตรวจสอบด้วย Vanillin-Sulfuric Acid 64
Reagent

รูปที่5 อุปกรณ์ Aqua Space Isolation 69

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ความหมายของสัญลักษณ์และคำย่อ

^0C	=	องศาเซลเซียส
Concrete	=	Wax ที่อิ่มตัวด้วยน้ำมันหอมระเหย
Finger print	=	ภาพลายนิ้วมือ
GC	=	Gas Chromatography
GC-MS	=	Gas Chromatography-Mass Spectroscopy
Marker	=	ตำแหน่งสารมาตรฐานใช้อ้างอิงตำแหน่งบนแผ่น TLC
Spot	=	ตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC
TLC	=	Thin Layer Chromatography

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทที่ 1
บทนำ

เครื่องหอมหรือสารหอม หมายถึงสิ่งของต่าง ๆ ที่ระเหยในอุณหภูมิห้อง หรือระเหิดเมื่อถูกความร้อน และให้กลิ่นที่พึงพอใจแก่มนุษย์ ตามประวัติศาสตร์เครื่องหอมเป็นเครื่องสำอางชนิดแรกที่มนุษย์รู้จักและนำไปใช้ มนุษย์รู้จักใช้เครื่องหอมในพิธีทางศาสนาในการบูชาสิ่งศักดิ์สิทธิ์ที่เชื่อ ถือกันมาแต่โบราณกาล (อรัญญา มโนสร้อย; 2529)

ความต้องการน้ำมันหอมระเหยหรือสารหอมในประเทศและทั่วโลกมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นทุกปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกน้ำมันหอมระเหยที่ไม่สามารถทำการสังเคราะห์ขึ้นมาทดแทนน้ำมันหอมระเหยจากธรรมชาติได้ จากรายงานของ Economic and Social Commission for Asia and the Pacific (ESCAP) เกี่ยวกับอุตสาหกรรมน้ำมันหอมระเหย พบว่า วัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดเป็นพืชท้องถิ่นที่สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทยและมีแนวโน้มเหมาะที่จะนำมาทำการผลิตน้ำมันหอมระเหยได้ (ธีระพล ประมวลกิจจา; 2524)

ในประเทศไทยมีการศึกษาเกี่ยวกับสารหอม ซึ่งศึกษาเรื่องการสกัดน้ำมันหอมระเหยและสารเคมีจากดอกไม้ชนิดต่างๆ คือ ดอกแก้ว (*Murraya paniculata*), ดอกสารภี (*Mammea siamensis*), ดอกราชาวดี (*Buddleja paniculafa*), ดอกลั่นทม (*Plumeria actifolia*), ดอกตีนเป็ด (*Alstonia scholaris*), ดอกจำปี (*Michelia alba*), ดอกกระทิง (*Caiophyllum inophyllum* Linn.), สาบเสือ(*Eupatorium odoratum* Linn.), สันพร้าหอม (*Eupatorium stoechadosmum* Hance.) ด้วยวิธี การกลั่นด้วยน้ำ (สุธีรา รุจิธรรมกุล และ ศุภรา ปิ่นจินดา; 2536) การศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากดอกไม้ไทย คือ ดอกมะลิ (*Jasminum sambac*), ดอกพิกุล (*Mimosops elengi*), ดอกแก้ว (*Murraya paniculata*), ดอกลั่นทม (*Plumeria acuminata*) สามารถสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ (solvent extraction) และ การสกัดโดยใช้ไขดูดซับ (enfluerage) (ศิริพร ธนะแพสย์ และ สุวรรณี เจริญพิชิตนันท์; 2523-24) นอกจากมีการสกัดสารหอมจากดอกไม้ในห้องปฏิบัติการแล้ว ในระบบอุตสาหกรรมได้มีการศึกษากระบวนการกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากใบและลำต้น คือ ใบโหระพา (*Ocium basilicum*), ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*), เปปเปอร์มิน (*Mentha piperita*) ด้วยวิธีการกลั่นชนิดใช้ไอน้ำโดยตรง (ชุบ เทศเจริญ; 2517)

เนื่องจากการพัฒนาของเทคโนโลยีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี (Chromatography-Mass Spectroscopy) ทำให้มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีการทดลองทำในพืชสกุล Scropulariacaea เช่น โหระพา (*Ocium basilicum*), โหรพาช้าง (*Limnophai aromatica*) ทำให้พบลักษณะโครงสร้างทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

แยกได้มีโครงสร้างแบบ sequiterpene และ diterpene รวมทั้งสามารถบ่งชี้ถึงสารเอกลักษณ์ (selectable marker) ในน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด เพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชและใช้สำหรับการวิเคราะห์หอมระเหยในเชิงปริมาณได้ (Thamrongvongsawad W. et.al.;1996)

ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้พยายามเสาะหาสารหอมชนิดใหม่เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ดอกกันเกรา (*Fagraea fragrans* Robx.) เป็นดอกไม้ที่มีกลิ่นหอม พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ของประเทศไทย นอกจากนั้นดอกกันเกรายังเป็นดอกไม้ประจำมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ในปัจจุบันยังไม่มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับสารหอมในดอกกันเกรา คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาวิธีการสกัดสารหอมจากดอกกันเกรา แล้วนำสารหอมที่สกัดได้มาแยกและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิคด้านแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรเมตรี และได้ตรวจสอบเอกลักษณ์ของภาพลายนิ้วมือ (finger print) ของสารสกัดจากดอกกันเกราโดยเทคนิครงคเลขผิวบาง (Thin layer Chromatography ; TLC) รวมทั้งทดสอบฤทธิ์ทางจุลชีววิทยา (antimicrobial test) ของสารหอมที่สกัดได้ เพื่อประเมินความสามารถในการฆ่าเชื้อต่อจุลินทรีย์บางชนิด จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial test) และ การหาโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดด้วยเทคนิคด้านแก๊สโครมาโทกราฟีกับแมสสเปกโทรเมตรี ทำให้สามารถเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและโครงสร้างทางเคมีของสารหอมที่สกัดที่ได้

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อสกัดน้ำหอมจากดอกกันเกรา โดยวิธีการต่าง ๆ แล้วทำการเปรียบเทียบปริมาณและคุณภาพของน้ำหอมที่ผลิตได้
2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากดอกกันเกรา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถเลือกวิธีที่เหมาะสมในการสกัดน้ำหอมจากดอกกันเกรา
2. ทราบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากดอกกันเกรา

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

1. ลักษณะอนุกรมวิธานของต้นกันเกรา

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Fragrea fragrans* Robx.วงศ์ : Potaliaceae ; Loganiaceae, ชื่อสามัญ: Common Tembusu, Anan, ชื่อพ้อง : ตำเสาหรือทำเสา (ภาคใต้), มันปลา (ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ), ตาเตรา (ชาวเขมร), ตะมูซู (ชาวไทยอิสลาม)

ลักษณะทั่วไป

กันเกรา ลักษณะเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ในช่วงเดือนเมษายน-มิถุนายน จะออกดอกเป็นช่อสีเหลือง มีกลิ่นหอม แม้กันเกราจะขึ้นอยู่ในที่ดินอันขาดความอุดมสมบูรณ์ ก็สามารถยืนต้นเจริญเติบโตได้อย่างงดงาม เนื้อไม้กันเกราแข็งและทนทานปลวกไม่สามารถทำลายได้ มีน้ำมันในเนื้อไม้ช่วยรักษาเนื้อไม้เป็นอย่างดีและขัดเงาได้สวยงามจึงเหมาะสำหรับการนำไปประดิษฐ์เป็นเครื่องใช้ เครื่องตกแต่งและใช้เป็นไม้สร้างบ้านได้ (ธนิตย์ หนูยิ้ม และคณะ;2539)

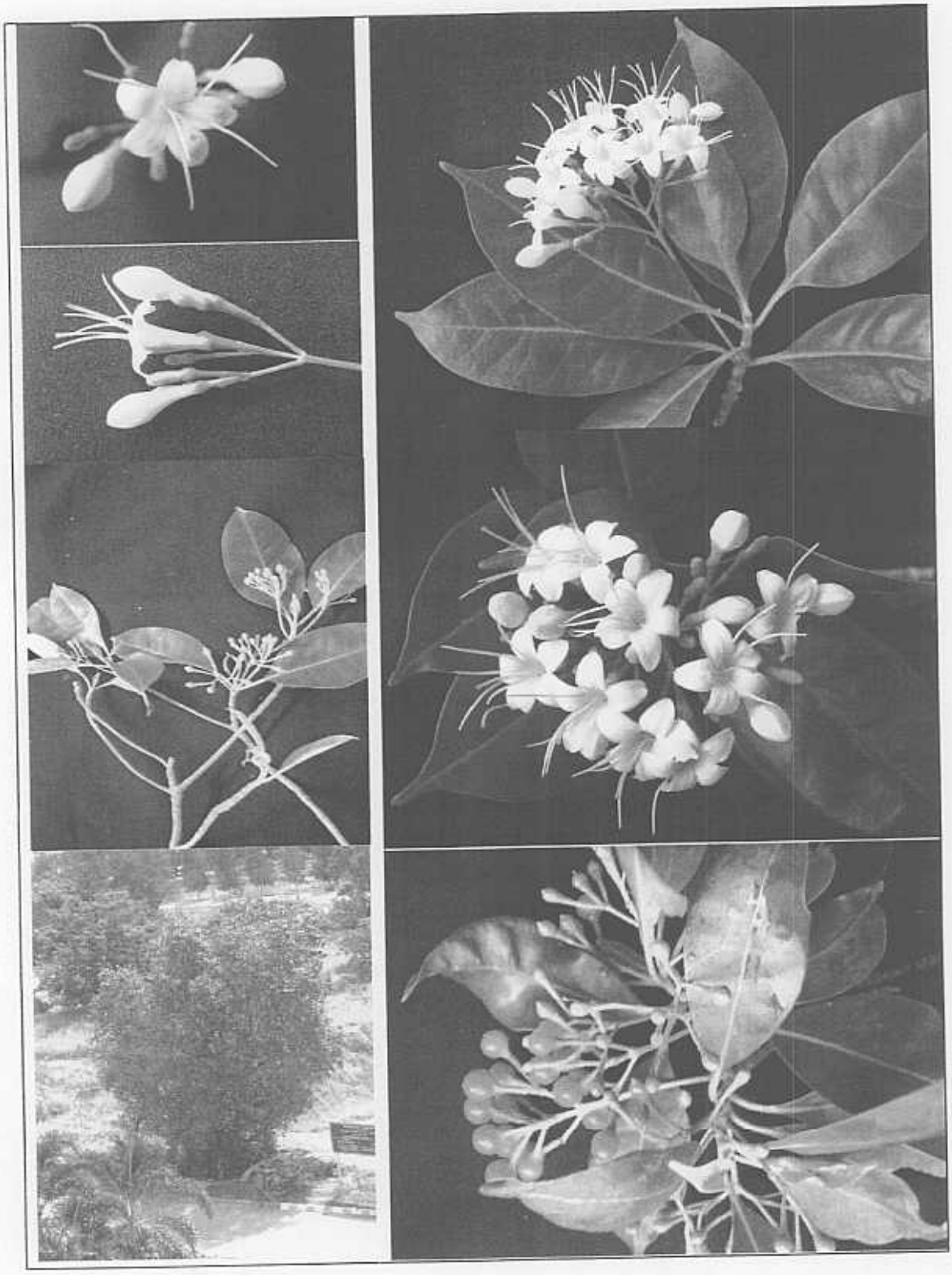
ลักษณะลำต้น : กันเกราเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่มีความสูงตั้งแต่ 20-40 เมตร ทรงต้นเป็นรูปทรงกระบอกทึบๆ มีเปลือกนอกหยาบ สีน้ำตาลแกมเหลืองถึงน้ำตาล ปนเทา แตกระแหงเป็นร่องลึก ไม่เป็นระเบียบ เปลือกในมีสีเหลือง เมื่อถากทิ้งไว้จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จะแตกกิ่งก้านสาขาออกไป ตรงปลายกิ่งจะห้อยลู่ลง

ลักษณะใบ : เป็นใบเดี่ยวเรียงตัวแบบเป็นเกลียว (spiral) เป็นกลุ่มตรงปลายกิ่งออกเป็นคู่ๆ ตรงข้ามกัน แผ่นใบมีรูปรี (eliptic) ขนาด 2.5-4.5 เซนติเมตร x 7-11 เซนติเมตร ปลายใบเป็นติ่งเรียวแหลม ฐานใบแหลม โคนสอบยาวแคบ ขอบใบเรียบ ผิวใบเกลี้ยง เส้นใบกลมกลืนกับสีแผ่นใบมองเห็นได้เด่นชัด ก้านใบยาว 1-2 เซนติเมตร หูใบคล้ายถั่วขนาดเล็กติดที่โคนใบ ใบกว้างประมาณ 1-2 นิ้ว ยาวประมาณ 4 นิ้ว ใบมีสีเขียวเข้มและมันใบจะหนาคล้ายกับแผ่นหนัง

ลักษณะดอก : เป็นดอกสมบูรณ์เพศ เมื่อเริ่มบานมีสีขาวนวลแล้วค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน และเหลืองเข้มเมื่อใกล้ร่วง ออกดอกเป็นช่อตามง่ามใบใกล้ยอดแต่ละดอกมีกลีบเลี้ยง 2 กลีบ โคนกลีบติดกันเป็นรูปแจกัน ยาวประมาณ 3 มิลลิเมตร ปลายดอกแยกออกเป็น 5 แฉก มีเกสรตัวผู้ยื่นพ้นปากดอกออกมาจำนวน 5 อัน ดอกมีกลิ่นหอม ออกดอกระหว่างเดือนเมษายน – มิถุนายน

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



รูปที่ 1 ภาพทางอนุกรมวิธานของกันเกรา

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ลักษณะผลและเมล็ด : ผลมีลักษณะเป็นผลเดี่ยว (simple friut) สด ลักษณะทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-8 มิลลิเมตร ผลอ่อนมีสีเหลืองปนส้ม ผลแก่มีสีแดงเลือดนก มีติ่งแหลมสั้นๆ ติดอยู่ส่วนบนสุดของผล ข้างในผลไม่มีผนังกั้น มีเมล็ดขนาดเล็กสีดำจำนวน 20-60 เมล็ด รูปทรงไม่แน่นอนฝังอยู่ในเนื้อนุ่มๆ สีแดง ช่อผล 1 ช่อมี 8-12 ผล ผลแก่ระหว่างสิงหาคม – พฤศจิกายน

การขยายพันธุ์ : ไม้กันเกราขึ้นได้ดีทั้งในที่ลุ่มบริเวณขอบพรุ พื้นที่น้ำขังชั่วคราวรวมถึงพื้นที่แห้งแล้งในพื้นดินทราย แต่จะไม่พบไม้กันเกราที่มีขนาดใหญ่ในบริเวณพรุ ซึ่งน้ำท่วมขังเกือบตลอดปี การกระจายพันธุ์พบทั่วไปในทุกภาคของประเทศไทย แต่มีมากทางภาคใต้ โดยเฉพาะแถบจังหวัดสงขลา ปัตตานี ยะลา นราธิวาส เป็นไม้ที่ชอบแสง พื้นที่ใดมีแสงลอดผ่านเพียง 10% ต้นกล้าจะตายภายใน 8 เดือน ในต่างประเทศพบไม้กันเกราที่ มาเลเซีย, อิ นเดีย, อินโดนีเซีย, พม่า, ฟิลิปปินส์ และ ซิลเบส (วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม)

2. **การใช้ประโยชน์จากต้นกันเกรา**

ประโยชน์โดยทั่วไป : กันเกราเป็นไม้เนื้อแข็ง มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ส่วนของเนื้อไม้มีสีเหลืองอ่อนเสี้ยนตรงเนื้อละเอียด มีความเหนียวและทนทานต่อการทำลายของปลวกมีน้ำมันในเนื้อไม้สามารถขัดเงาได้ดี เป็นหนึ่งในไม้มงคลที่นำมาประกอบการวางศิลาฤกษ์ สิ่งก่อสร้างอาคาร เหมาะสำหรับการสร้างบ้านเรือน ทำเสาประตู อกไก่ ที่ต้องการความทนทานแข็งแรง นอกจากนี้ยังมีการนำเอาไม้กันเกรามาทำโครงเรือ กระดูกงู เสากระโดงเรือ (ธนิตย์ หนูยิ้ม และคณะ;2539)

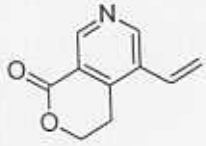
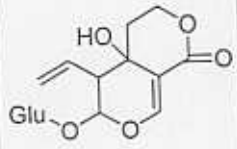
ประโยชน์ทางด้านเภสัชวิทยา : สำหรับคุณค่าทางยาเปลือกไม้กันเกราสามารถนำมาทำยาเพื่อบำรุงโลหิต แก้ผิวหนังพุพองปวดแสบปวดร้อน ส่วนของแก่นไม้มีรสเฝื่อน ฝาดขม ใช้ยาบำรุงธาตุ แก้ไข้จับสั่น อาการหืด ไอ ริดสีดวง ท้องมาน แน่นหน้าอก ท้องเสียเป็นมูกเลือด แก้ฝีดาษ เป็นต้น ดอกมีกลิ่นหอม(ธนิตย์ หนูยิ้ม และคณะ;2539) , ใบ แก้หืด และ รักษาโรคผิวหนังพุพอง พบว่า ใบและผลมีสารแอลคาลอยด์ชื่อ gentianine มีฤทธิ์แก้ปวด ส่วนสารกัดแอลกอฮอล์ของแก่นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาเลเรียชนิดฟาซิฟารัมในหลอดทดลอง (วงศ์สถิต ฉั่วกุล และ คณะ;2541)

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

3. สารเคมีในต้นกันเกรา

ตารางที่ 1 แสดงสารประกอบในใบกันเกรา

ลำดับ	สารเคมี	โครงสร้าง	ชนิดของสารเคมี	ส่วนของพืช	เอกสารอ้างอิง
1	Gentianine		Alkaloid	ใบ	อัมพร คุณเอนก, 2537
2	Swirtiamarin		Glucoside	ใบ	อัมพร คุณเอนก, 2537

4. น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันส่งกลิ่นระเหย มีทั้งสารที่ให้กลิ่นหอม และเหม็นเป็นองค์ประกอบ ซึ่ง Webster "s New International Dictionary ได้กำหนดความหมายของน้ำมันส่งกลิ่นระเหยไว้ว่า "เป็นน้ำมันที่มีกลิ่นระเหยได้ซึ่งเกิดขึ้นในพืช จึงทำให้พืชนั้นมีกลิ่น และคุณสมบัติพิเศษ"(ประดิษฐ์ เชี่ยวสกุล ,2501) ซึ่งลักษณะของกลิ่นหอมที่ได้จากพืชมีได้ 3 ลักษณะ คือ essential oil , flower oil , gum หรือ exudates สิ่งหอมที่ได้จากพืชมีหลายชนิดทั้งนี้เนื่องจากสามารถได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช แทบทุกส่วน แต่ส่วนใหญ่จะได้จาก ดอก ใบ เปลือกลำต้น ราก หรือ เหง้า และบางชนิดอาจได้ทั้ง ลำต้น และใบ ซึ่งสิ่งหอมที่ได้จากเปลือกผลไม้จะใช้มากที่สุดในอุตสาหกรรมผลิตเครื่องสำอาง เนื่องจากเป็นวัตถุดิบที่หาง่าย มีจำนวนมาก และราคาถูก สำหรับสิ่งหอมที่ได้จากดอกนั้นราคาจะสูงมาก

ในปัจจุบันปรากฏว่า ปริมาณความต้องการน้ำหอมในประเทศไทย และทั่วโลกมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นทุกปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกน้ำมันหอมระเหยที่ไม่สามารถทำการสังเคราะห์ขึ้นมาใช้ทดแทนน้ำมันหอมระเหยจากธรรมชาติได้ จากรายงานของ ESCAP เกี่ยวกับอุตสาหกรรมน้ำมันหอมระเหย ปรากฏว่า วัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมน้ำมันหอมระเหย หลายชนิดเป็นพืชท้องถิ่นที่สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทย และอาจพบได้ในบางพื้นที่ของประเทศ ซึ่งมีแนวโน้มเหมาะที่จะนำมาทำการผลิตน้ำมันหอมระเหย (ธีระพล ประมวลกิจจา,2524)

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

กลิ่นหอมตามธรรมชาติเป็นปรากฏการณ์ที่สำคัญของการเมตาโบลิซึม โดยกลิ่นที่ได้เกิดจากการผสมกันของอินทรีย์สารที่ซับซ้อน ซึ่งอยู่ในพืช แบ่งได้เป็น 2 ชนิด

1. กลิ่นที่ละลายได้ในไขมัน (lipophilic) ซึ่งเรียกว่า น้ำมันหอมระเหย
2. กลิ่นที่ละลายได้ในน้ำ (hydrophilic)

น้ำมันหอมระเหยจะระเหยได้ง่าย และมีปริมาณน้อยมากในพืช เป็นสารผสมที่มีองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่เป็นพวกเทอร์พีนอยด์ (Terpenoid) ส่วนประกอบทางเคมีที่เป็นหลักใหญ่ได้แก่ (สุชีรา รุจิธรรมกุล, ศุภรา ปิ่นจินดา,2536)

1. Ester : ส่วนมากเป็น ester ของ benzoic acid , acetic acid , salicylic acid และ cinnamic acid
2. Alcohol : linarool , geraniol , citronellol , terpentiol , menthol
3. Aldehyde : citral , vanillin , cinnamaldehyde , benzaldehyde
4. Acid : benzoic acid , cinnamic acid , isovalic acid
5. Phenol : eugenol , thymol , carvaerol
6. Ketone : carvones , menthone , camphor
7. Lactone : coumarin
8. Terpine : comphene , pinene
9. Hydrocarbon : cymene , styrene

5. กรรมวิธีในการนำสิ่งหอมออกจากพืช

ในการนำสิ่งหอมออกจากส่วนต่าง ๆ ของพืช กระทำได้โดย

1. Distillation (การกลั่น)
2. Expression (การบีบ)
3. Extraction (การสกัด)
   - 3.1 Enfleurage (วิธีการสกัดโดยใช้ไขเย็นดูดซับ)
   - 3.2 Maceration (วิธีการสกัดโดยใช้ไขร้อนดูดซับ)
   - 3.3 Solvent extraction (การสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ)

5.1 การกลั่น (Distillation)

หลักการ : น้ำมันหอมระเหยจะถูกไอน้ำพาออกมา ซึ่งการกลั่นน้ำมันหอมระเหยแบ่งเป็น 3 วิธี คือ

Water distillation (การกลั่นด้วยน้ำ)

Steam distillation (การกลั่นด้วยไอน้ำ)

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Water-steam distillation (การกลั่นด้วยน้ำ-ไอน้ำ)

5.1.1 **การกลั่นด้วยน้ำ**(Water distillation)

เป็นการใช้ความร้อนแก่ภาชนะซึ่งใส่น้ำ และพืช เมื่อน้ำ และน้ำมันหอมระเหยระเหยขึ้นไปถึง Condenser จะกลั่นตัวแล้วนำของเหลวที่ได้ไปแยกน้ำมันหอมระเหย เครื่องมือที่ใช้ คือ Cleverneaur 's apparatus ทั้งแบบที่น้ำมันหอมระเหยที่เบากว่าน้ำ และ น้ำมันหอมระเหยที่หนักกว่าน้ำ (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล,2532)

5.1.2 **การกลั่นด้วยไอน้ำ** (Steam distillation)

การกลั่นแบบนี้ไม่มีน้ำอยู่ก้นหม้อกลั่น พืชจะถูกว่างบนตะแกรง ไอน้ำจะมาจากหม้อต้มน้ำอีกใบ จะเข้าสู่พืชบนตะแกรงเป็นไอน้ำอิ่มตัว หรือ Slightly superheated steam (สมเด็จพระเจ้าลูกเธอเจ้าฟ้าจุฬาภรณ์วลัยลักษณ์ฯ, 2522)

5.1.3 **การกลั่นด้วยน้ำ-ไอน้ำ** (Water-steam distillation)

การวางพืชบนตะแกรงไว้เหนือระดับน้ำแล้วผ่านไอน้ำบนพืช ไอน้ำจะพาเอาน้ำมันหอมระเหยไปยัง Condenser

อย่างไรก็ตามการกลั่น 3 วิธีข้างต้น มีกระบวนการคล้ายคลึงกัน (ธีระพล ประมวลกิจจา ,2524) ดังแผนภาพที่ 1

แผนภาพที่ 1 กระบวนการกลั่นน้ำมันหอมระเหย

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

5.2. **การบีบ** (Expression)

หลักการ : เป็นการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีบีบ เพื่อนำน้ำมันหอมระเหยออกจากพืช (Poucher W.A.,1994)

5.3 **การสกัด**(Extraction)

แบ่งเป็น 3 วิธีคือ

5.3.1 **การสกัดโดยใช้ไขเย็นดูดซับ** (Enfluerage **หรือ** Cold fat extraction)

หลักการ ใช้ไขดูดซับน้ำมันหอมระเหย โดยการนำดอกไม้เรียงลงบนไขดูดซับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงทำการเปลี่ยนดอกไม้ กระทำจนไขมันอิ่มตัวไปด้วยน้ำมันหอมระเหยแล้ว จึงสกัดน้ำมันหอมระเหยออกจากดอกไม้ด้วยแอลกอฮอล์ (Poucher W.A., 1994) ดังแผนภาพที่ 2

แผนภาพที่ 2 วิธีการสกัดโดยใช้ไขดูดซับน้ำมันหอมระเหย

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

5.3.2 **วิธีการสกัดโดยใช้ไขร้อนดูดซับ** (Maceration extraction **หรือ** hot fat extraction)

หลักการ : เป็นการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยการหมักดอกไม้ในไขมันที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส แล้วน้ำมันหอมระเหยจะละลายออกมาจนกระทั่งไขมันอิ่มตัวด้วยน้ำมันหอมระเหย จากนั้นนำไปสกัดด้วยแอลกอฮอล์แล้วแยกแอลกอฮอล์ออก จะได้น้ำมันหอมระเหย (อรัญญา มโนสร้อย, 2529) ดังแผนภาพที่ 3

แผนภาพที่ 3 การสกัดโดยการแช่ไขมันที่ร้อน

5.3.3 **การสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ** (Solvent extraction)

หลักการ : การสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ ตัวทำละลายจะแทรกข้าไปในดอกไม้ และ ละลายเอาน้ำมันหอมระเหยไข สี ออกมาจากนั้นนำตัวทำละลายมาระเหยออก จะได้น้ำมันหอมระเหย พบว่า petroleum ether เป็นสารระเหยที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันหอมระเหย (อรัญญา มโนสร้อย, 2529)

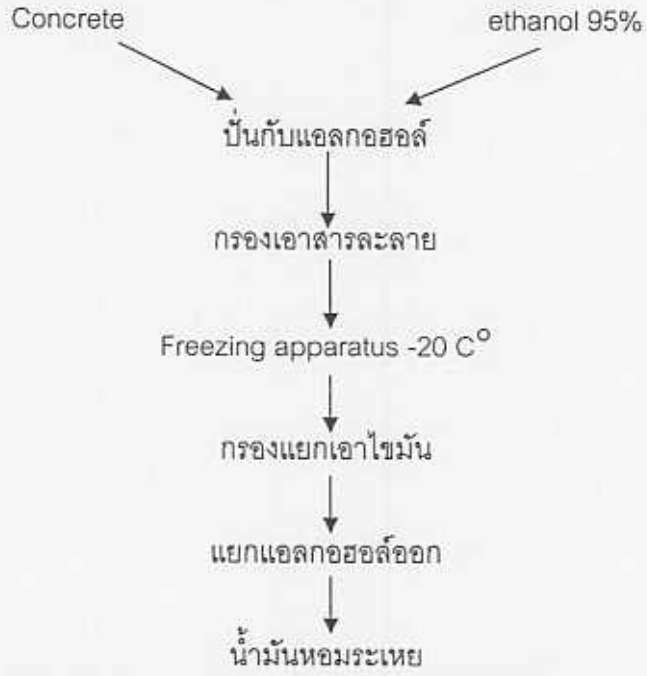
ตัวทำละลายควรมีคุณสมบัติดังนี้ (ศิริพร ธนะแพสย์ และ สวรรณี เจริญพิชิตนันท์, 2523)

1. ต้องละลายกลิ่นของดอกไม้ได้สมบูรณ์ หมดจด และ รวดเร็ว ในขณะเดียวกันละลายสารแปลกปลอมอื่น ๆ ได้น้อย
2. ต้องมีจุดเดือดต่ำ สามารถกลั่นไล่ตัวทำละลายออกไปได้ง่าย โดยไม่ใช้อุณหภูมิสูง แต่ต้องไม่มีจุดเดือดที่ต่ำจนเกินไป เพราะจะทำให้เสียคุณสมบัติละลายได้ขณะทำการสกัด
3. ตัวทำละลายต้องไม่ละลายเข้ากับน้ำ เพราะน้ำในดอกไม้จะออกมาปนกับตัวทำละลาย
4. ตัวทำละลายต้องมีจุดเดือดที่แน่นอน และ เมื่อระเหยไปแล้วจะไม่เหลือสารที่มีผลต่อกลิ่นของน้ำมันที่สกัดได้
5. ตัวทำละลายควรเป็นสารเฉื่อยไม่ทำปฏิกิริยากับสารในดอกไม้ และ น้ำมันที่สกัดได้
6. ตัวทำละลายที่ใช้ควรมีราคาต่ำ และ เป็นสารไม่ติดไฟ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

การสกัดน้ำมันหอมระเหยออกจาก Concrete



แผนภาพที่ 4 การสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีสกัดด้วยทำละลาย

6. การตรวจสอบคุณสมบัติน้ำมันหอมระเหย

6.1 การตรวจสอบคุณสมบัติน้ำมันหอมระเหยทางเคมี

6.1.1 การตรวจสอบด้วยเทคนิคด้านแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี

หลักการ : เป็นเครื่องมือที่ประกอบด้วย gas chromatography ต่อกับ mass spectrometer ใช้วิเคราะห์หาองค์ประกอบของของผสมว่าประกอบด้วยสารอะไรบ้าง โดยใช้สารตัวอย่างในปริมาณที่น้อยมาก เหมาะกับสารที่ทนความร้อน และ กลายเป็นไอได้ เครื่องมือชนิดนี้มักมีข้อมูลทาง mass spectra ของสารที่ทราบโครงสร้างแล้ว (spectral library) นับหมื่นชนิดไว้สำหรับเปรียบเทียบ (กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ, 2541)

6.1.2 การตรวจสอบน้ำมันหอมระเหยโดย thin layer chromatography (TLC Finger print)
หลักการ : โดยอาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างกัน การแยกสารโดยการ spot สารลงไปบน stationary phase เคลือบบน support ที่เป็นแก้ว, aluminum หรือ polyethylene จากนั้นนำแผ่น stationary phase ที่ได้ไปจุ่มใน mobile phase ซึ่งสามารถซึมผ่านไปบน stationary phase และ พาเอาสารติดขึ้นไปด้วย เมื่อใช้ mobile phase ต่างชนิดกันก็สามารถแยกสารผสมที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันออกจากกันได้(อ้อมบุญ ล้วนรัตน์; 2536)

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เหตุผลในการเลือกใช้วิธี TLC

1. เวลาที่ใช้ในการทดสอบสั้น
2. การเลือกวิธีตรวจสอบที่จำเพาะ ทำให้สามารถวิเคราะห์ชนิดของสารได้
3. สารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติทางกายภาพแตกต่างกัน ทำให้ได้สี และ การเคลื่อนที่ที่มีความจำเพาะของแต่ละสาร เรียกว่า finger print ซึ่งเหมาะที่จะใช้พิสูจน์ชนิดหรือความบริสุทธิ์ของสาร
4. การวิเคราะห์โดยวิธีรงคเลขผิวบางมีความเหมาะสม ในการวิเคราะห์แยกองค์ประกอบของสารที่ผสมกันอยู่ และ สารเคมีที่สกัดจากพืช โดยการนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานบริสุทธิ์

ในการเตรียม Chromatographic finger print ที่เป็นมาตรฐานใช้ในการพิสูจน์ชนิดของสาร โดยอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพที่แน่นอนของสาร โดยมีการกำหนดสภาวะการทำการทดลองที่แน่นอนสามารถแยกสารผสมได้ดีที่สุด รวมทั้งสารที่สกัดจากพืช โดยอาจมีการเตรียมเป็น Photographic TLC atlas คือ การถ่ายภาพลักษณะของ finger print เพื่อใช้เปรียบเทียบและบ่งบอกถึงชนิดของสาร

ในการประเมินผล TLC ถ้าสารมี R_f value (R_f value เท่ากับ ระยะทางที่สารเคลื่อนที่/ระยะทางที่ (mobile phase) เท่ากับ reference ก็แสดงว่า ในสารสกัดนั้นอาจมีสารชนิดเดียวกับ reference ทั้งนี้ในการทดลองต้องมีการกำหนดสภาวะที่เหมือนกับอันประกอบด้วย solvent system และ ข้อมูลอื่น ๆ ประกอบด้วย สารดูดซับ ระบบนำพาสาร สารตรวจสอบ

เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยสารองค์ปรกอบที่แตกต่างกันมากทั้งในด้านคุณสมบัติ และ ปริมาณ การตรวจสอบวิเคราะห์ดูสารองค์ประกอบด้วยวิธี TLC จึงจำเป็นต้องเลือกใช้ระบบตัวนำพาสาร (solvent system) ที่เหมาะสมเพื่อให้การแยกสารต่าง ๆ ให้เห็นได้อย่างชัดเจน รวมทั้งการใช้สารตรวจสอบ (detecting reagent) ที่สามารถให้สีของ spot ต่าง ๆ ที่เด่นชัดของแต่ละองค์ประกอบ (อ้อมบุญ ล้วนรัตน์,2536)

6.2 การตรวจสอบคุณสมบัติน้ำมันหอมระเหยทางจุลชีววิทยา

หลักการ : เป็นการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารสกัด โดยวิธี disc agar diffusion method การดูผลของสารสกัดต่อการเจริญของแบคทีเรียใน culture ดูได้หลายวิธีการหาความไวของเชื้อต่อยา (drugs sensitivity) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมทำกันมาก การทดสอบความไวของเชื้อต่อยา วิธี disc agar diffusion method หรือ disc method เป็นวิธีที่นิยมโดยเตรียมเพาะเชื้อเทียบความขุ่นเท่ากันที่ความยาวคลื่น 560 nm เปอร์เซ็นต์ transmittance 80 แล้วใช้ Sterile swab spread เชื้อแบคทีเรียให้ทั่ว plate โดย Spread 3 dimension แล้ววาง filter paper

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

disc ที่ชุบยาปฏิชีวนะวางบน plate นำไป incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ดู clear zone (นันทนา อรุณฤกษ์,2537)

ในปัจจุบันพบว่ายังไม่มีการศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีของดอกกันเกราและการใช้ประโยชน์จากดอกกันเกรา ดังนั้นคณะผู้วิจัยนี้จึงมีความสนใจศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกกันเกรา, ศึกษาโครงสร้างของสารสารสกัดด้วยเครื่องมือแก๊สโคมาโทกราฟฟี-แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS), การหาวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมของรงคเลขผิวบาง (TLC) เพื่อใช้ในการแยกสารประกอบของ Absolute จากสารสกัดในดอกกันเกรา, ในการทำ TLC finger print เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์และยืนยันชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบ, รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อของ Absolute จากสารสกัดในดอกกันเกราต่อเชื้อ Staphylococcus *aureus, Escherichia coli, Psudomonas* spp.

จากการศึกษาดังกล่าวคาดว่าจะได้ทราบถึงวิธีการสกัดดอกกันเกราที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้ได้สารสกัดซึ่งใกล้เคียงธรรมชาติที่สุดโดยการเปรียบเทียบจากวิธีที่ทำการสกัดทั้งหมด และทำระบบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมของรงคเลขผิวบาง(TLC) ในการแยกสารประกอบจากสารสกัดดอกกันเกราเพื่อใช้ในการเตรียม TLC finger Print นอกจากนั้นยังทราบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas spp.* รวมทั้งเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารหอมในดอกกันเกรา

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

ชุดระเหยแบบลดความดัน Rotary Evaporator พร้อมอุปกรณ์ rotavapor (Buchi, Switzerland), ตู้ปรับอุณหภูมิ -20° C (Sanyo, Japan), อ่างปรับอุณหภูมิแบบเขย่า รุ่น Heto/SBD 50 (BIO, Denmark), ตู้มืดติดหลอดอุลตราไวโอเลต รุ่น DG 131300 (Desaga, Germany), TLC plate 1.05735 DC- Plastikfolien kieselgel 60F254 (Merck, Germany), กระดาษกรอง เบอร์1 Qualitative circles 125 mm ϕ (Whatman, England), Hot plate รุ่น sp 46920-26 sp 47230-29 (Themolyne, USA), เครื่องชั่งละเอียดชนิดไฟฟ้า (Balance) รุ่น Mettler/AB 204 (Mettler-Toledo, Ltd., Switzerland), Hot air oven (WTB binder, USA), Autoclave (H-88LL, Japan)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ชนิด Analytical grade ประกอบด้วย Absolute alcohol, Petroleum ether, Toluene , Methanol, Acetic acid (Merck, Germany), Acetone, Ethyl acetate (BDH laboratory supplies, England), Chloroform, Hexane, Sulfuric acid (J.T. baker, USA), Eugenol (Srichand United Dispensar co.,Ltd, Germany), Vanillin RBH (Farmitalia Carlo, Brazil), Nutrient agar, Nutrient broth Mikrobiologic (Merck, Germany), ไขหมูและไขวัวได้จากการสกัดโดยวิธีใช้ความร้อน (หัวข้อวิธีการทดลองที่ 3.2)

2. พืชที่ใช้ในการทดลอง

ดอกกันเกราที่บานเต็มที่ จากต้นกันเกราอายุมากกว่า 20 ปีขึ้นไป ออกดอกในระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม ปลูกในบริเวณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

3. วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกกันเกรา

3.1 วิธีเตรียมดอกกันเกรา

เก็บดอกกันเกราในช่วงเช้า เวลาประมาณ 5.00-7.00 น. นำดอกกันเกราที่เก็บมาแล้วนำมาเด็ดเอาก้านดอกออก ให้เหลือแต่ส่วนของกลีบเลี้ยง, กลีบดอก, เกสรตัวผู้, เกสรตัวเมีย

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

3.2 **วิธีการเตรียมไขหมูไขวัว**

หั่นไขหมูเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ให้ความร้อน 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำน้ำมันหมูกรองด้วยกระดาษเบอร์ 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร ส่วนไขวัวก็ทำเหมือนกับไขหมู

3.3 **วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกกันเกราโดยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำ** (Steam Distillation)

เตรียมดอกกันเกราโดยตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ความยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งละเอียดชนิดไฟฟ้า นำดอกไม้ใส่ในขวดก้นกลมเติมน้ำปริมาตร 800 มิลลิลิตร ต่อประมาณดอกไม้ 150 กรัม ให้ความร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้น้ำ และน้ำมันหอมระเหยแยกชั้นกัน ทำการแยกน้ำมันหอมระเหยโดยใช้กรวยแยก ชั่งน้ำมันหอมระเหยด้วยเครื่องชั่งละเอียดชนิดไฟฟ้า นำไปคำนวณร้อยละของผลิตภัณฑ์

$$\text{ร้อยละของผลิตภัณฑ์} = \frac{\text{น้ำหนักน้ำมันหอมระเหย (กรัม)} \times 100}{\text{ปริมาณดอกกันเกรา (กรัม)}}$$

3.4 **การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกกันเกราโดยใช้ไขเย็นดูดซับ** (Enfluerage)

ขั้นตอนการสกัดเริ่มจากเตรียมถาดที่แห้งและสะอาด หลอมไขวัวและไขหมูรวมกันในอัตราส่วน 3:2 ให้ได้น้ำหนักรวม 180 กรัม (ไขวัว:ไขหมู 108 :72 กรัม) ชั่งไขหมูและไขวัวด้วยเครื่องชั่งละเอียดชนิดไฟฟ้า เทไขในถาดขนาด 22x45 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้แข็งตัว เรียงดอกไม้ให้กลีบดอกสัมผัสกับไขหมูและไขวัวให้มากที่สุดในอัตราน้ำหนักดอกไม้ 30 กรัมต่อพื้นที่ 22x45 ตารางเซนติเมตรต่อน้ำหนักไข 180 กรัม ปิดปากถาดให้สนิทด้วย aluminum foil เปลี่ยนดอกไม้ทุก 24 ชั่วโมง จนไขอิ่มตัวด้วยน้ำมันหอมระเหยเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นขูดไขออกจากถาดใส่ในบิกเกอร์ สกัดน้ำมันหอมระเหยโดย เติม absolute alcohol (Merck, Germany) ใช้ปริมาตร 400 มิลลิลิตรต่อปริมาณไข 180 กรัม ปิดด้วย aluminum foil ให้ความร้อนพร้อมกวนไขโดย magnetic stirr บนเครื่อง Hot plate อุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารละลายนั้นไปแช่เย็นในตู้ปรับอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ กรองเอาสารละลายใสออกด้วยกระดาษกรองเบอร์1, เส้นผ่านศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร นำสารละลายใสนั้นมาระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน Rotary Evaporator เก็บ concrete ที่ได้ในขวดชั่งสารที่ชั่งน้ำหนักแล้ว ปิดด้วย aluminum foil ที่เจาะรู เก็บไว้ในตู้ที่มิดชิดเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยเป็นเวลา 7 วัน นำมาชั่งหาน้ำหนักที่คงที่ นำ concrete มาสกัดต่อด้วยวิธีการสกัดหัวน้ำมันหอม (absolute extraction) ต่อไป (ดูจากการทดลองที่ 3.7)

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

3.5 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกกันเกราด้วยไขร้อน (Hot Fat Extraction)

หลอมรวมพร้อมทั้งกวนไขหมูและไขวัวด้วย magnetic stirr ในอัตราส่วนของไขหมูต่อไขวัว 1:1 ปริมาณอย่างละ 220 กรัม เติม Absolute ethanol ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ให้ความร้อนอุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส ปิดปากภาชนะด้วย aluminum foil เติมดอกกันเกรา ปริมาณ 30 กรัม ให้ความร้อนเท่าเดิมพร้อมกวนด้วย magnetic stirr เป็นเวลา 30 นาที แล้วเปลี่ยนดอกไม้ปริมาณ 30 กรัม เติมในสารละลายเดิมอีกครั้ง เปลี่ยนดอกกันเกราทุกๆ 30 นาที ทำเช่นเดิมจนไขอิ่มตัวด้วยน้ำมันหอมระเหยจำนวน 6 ครั้ง นำไปแช่เย็นใน ตู้ปรับอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ กรองสารละลายใสด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1, เส้นผ่านศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร (Merck, Germany) นำสารละลายใสนั้นมาระเหยโดยเครื่องสกัดสมุนไพรแบบลดความดัน Rotary Evaporator เก็บ concrete ที่ได้ในขวดชั่งสารที่ชั่งน้ำหนักแล้ว ปิดด้วย aluminum foil ที่เจาะรู เก็บไว้ในตู้ที่มิดชิดเพื่อให้สารละลายระเหยเป็นเวลา 7 วัน นำมาชั่งหาน้ำหนักที่คงที่ นำ concrete มาสกัดต่อด้วยวิธีการสกัดหัวน้ำมันหอม (absolute extraction) ต่อไป (ดูจากการทดลองที่ 3.7)

3.6 การสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ (Solvent Extraction)

ชั่งดอกกันเกราน้ำหนักที่แน่นอน บรรจุในขวดสีชา ตวงตัวสารสกัด absolute alcohol ในปริมาตร 600 มิลลิลิตรต่อประมาณดอกกันเกรา 55 กรัม (หรือเติมสาร absolute alcohol จนท่วมดอกกันเกราทั้งหมด) ปิดปากขวดให้สนิทเก็บไว้เป็นเวลา 7 วัน สำหรับ petroleum ether hexane, acetone, toluene acetone ผสมกับ petroleum ether (30:70) ก็ทำเช่นเดียวกับ absolute alcohol แยกดอกไม้ออกจากตัวทำละลาย นำตัวทำละลายมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1,เส้นผ่านศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร (Merck, Germany) นำสารละลายที่ได้ไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องสกัดสมุนไพรแบบ volatile oil เก็บ concrete ที่ได้ในขวดชั่งสารที่ชั่งน้ำหนักแล้วปิดด้วย aluminum foil ที่เจาะรู เก็บไว้ในตู้ที่มิดชิดเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยเป็นเวลา 7 วัน นำมาชั่งหาน้ำหนักที่คงที่ นำ concrete มาสกัดต่อด้วยวิธีการสกัดหัวน้ำมันหอม (absolute extraction) ต่อไป (ดูจากการทดลองที่ 3.7)

3.7 การสกัดหัวน้ำหอม (Absolute extraction)

นำ concrete ที่ได้ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติม absolute alcohol ปิดฝาให้สนิท นำไปวางบนอ่างปรับอุณหภูมิแบบเขย่า ใช้อุณหภูมิห้อง เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปแช่เย็นในตู้ปรับอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส รอจนสารละลายและไขแยกกันใช้เวลาประมาณ 2 สัปดาห์ กรองด้วย

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

กระดาษกรองเบอร์ 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร เก็บส่วนที่เป็นสารละลายไว้เรียกว่า absolute

4. การทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจากดอกกันเกรา

4.1 Gas Chromatography – Mass Spectrometry Test

การแยกวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของสารหอมจากดอกกันเกรา ใช้วิธี Gas Chromatography- Mass Spectroscopy โดยใช้ GC/MS Varian Saturn 3 GC/MS system ที่ต่อกับ J&W DB-5 fused silica capillary column ขนาด 30 m x 0.26 mm (0.25 μm film thickness). และมีการเพิ่มอุณหภูมิของ oven จาก 60° C เป็น 240° C ด้วยอัตราเร็ว 3° C /min; มีอุณหภูมิที่ injector, 220° C ; .split injection,(1:100); carrier gas, helium (flow rate 1 ml/min). ,สำหรับ MS operation parameter ใช้ EI positive mode; ion source 70 eV ; ion source temperature 220° C ; emission current, 220 μA. Mass spectra ที่ได้อยู่ในช่วง 40 ถึง 300 amu range at 1.01 scan/sec. การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยโดยใช้ mass spectra เปรียบเทียบกับ MS library search (NIST Program : National Institute of Standard, USA). สามารถคำนวนหาปริมาณสารจาก GC peak areas.

โดยสารที่นำไปศึกษาโครงสร้างโดยเครื่อง GC-MS คือ Absolute ที่สกัดโดยตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ (organic solvent) โดยใช้ hexane และ petroleum ether

4.2 การหาวัฏภาคเคลื่อนที่ (Solvent System) ที่เหมาะสมของ TLC

เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ (Solvent System) ในปริมาตร 20 มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 วัฏภาคเคลื่อนที่ (Solvent System) ที่ใช้ในการทดลอง

วัฏภาคเคลื่อนที่ (Solvent System)	อัตราส่วน
Chloroform : Methanol	95:5
Toluene : Ethyl Acetate	97:3 85:15 90:10
Chloroform : Toluene	75:25
Distillation Water : Ethanol	30:70
Chloroform : Acetic Acid	99:1
Toluene : Acetone : Chloroform	40:25:35
Methanol : Chloroform :Acetic Acid	49.5:49.5:1

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Spot สาร Absolute ที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ลงบน TLC plate 1.05735 DC-Plastikfolien kieselgel 60F254 (Merck, Germany) จำนวน 10 ไมโครลิตร นำ TLC plate จุ่มใน solvent system ให้วัฏภาคเคลื่อนที่เคลื่อนจากจุดเริ่มต้นถึงจุดที่กำหนดระยะทางยาว 10 เซนติเมตร นำ TLC plate ออกเป่าด้วยลมเย็นให้แห้ง ตรวจสอบด้วยแสงการดูดกลืนแสง Ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 266 และการเรื่องแสงที่ 325 นาโนเมตร จากนั้นพ่นด้วย Vanillin-Sulfuric acid reagent โดยพ่น Ethanolic – Vanillin 1% ตามด้วยพ่น Ethanolic – Sulfulic acid 10% แล้วนำแผ่น TLC ที่ยังเปียกไปให้ความร้อนที่ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส วางจนเกิดสีบนแผ่น TLC ชัดเจน จากนั้นทำการถ่ายภาพในแต่ละขั้นตอนการตรวจสอบ

4.3 **การทดสอบ ความไวของเชื้อต่อสารสกัด** (Antimicrobial Screening Test)

โดยใช้วิธี disc agar diffusion method เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Merck, Germany) และชนิดเหลว (Merck, Germany) เทียบความขุ่นของเชื้อ *S.aureus*, *E.coli*, *Ps.aeruginosa* ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ให้มีความขุ่นที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เปอร์เซ็นต์ Transmittance เท่ากับ 80 ขั้นตอนต่อไปนี้ทั้งหมดทำในตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) ใช้ไม้พันสำลีที่ปลอดเชื้อจุ่มในเชื้อที่เทียบความขุ่นแล้ว กระจายเชื้อให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง เป็น 3 ทิศทาง แต่ละทิศวางมุม 60 องศา วาง filter paper disc ที่จุ่ม Absolute ที่สกัดจาก acetone, acetone ผสมกับ petroleum ether, enfluerage, ethanol, hexane, maceration, petroleum ether และ เปรียบเทียบกับ absolute alcohol แต่ละ paper disc วางห่างขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิเมตร วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อกระจายอยู่ วางห่างกันประมาณ 15-20 มิลลิเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ดูความสามารถในการยับยั้งเชื้อโดยการวัด inhibition zone

4.4 **การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเทียบกัน** Standard eugenol (Evaluation of Antimicrobial Activity with Standard Eugenol)

นำเชื้อที่ absolute มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ ทดสอบต่อโดยวิธีดังการทดลอง 4.4 โดยใช้ standard eugenol ใน absolute alcohol (1:20) เทียบกับ Absolute แล้วดูความสามารถในการยับยั้งเชื้อโดยการดู Inhibition zone

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหย

ตารางที่ 3 ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีต่างๆ

วิธีการสกัดสาร	นน.Concrete ต่อ นน.ดอกไม้ (%)	ลักษณะ Absolute	
		สี *	กลิ่น
Steam Distillation	-	ไม่สามารถกลั่นน้ำมันหอมระเหยออกมาได้	
Enfluerage	1.2299	เหลือง+++	กลิ่นคล้ายดอกกันเกราแต่มีกลิ่นหืนของไขสัตว์
Hot Fat Extraction	1.7607	เหลือง+++++	กลิ่นคล้ายดอกกันเกราแต่มีกลิ่นหืนของไขสัตว์
Solvent Extraction			
Acetone	0.3588	น้ำตาลส้ม	กลิ่นไม่คล้ายดอกกันเกรา
Acetone + Petroleum Ether	1.5256	เขียวอ่อน	กลิ่นไม่คล้ายดอกกันเกรา
Ethanol	0.2380	เหลือง+	กลิ่นไม่คล้ายดอกกันเกรา
Hexane	0.0983	เหลือง++++	กลิ่นคล้ายดอกกันเกรา
Petroleum Ether	0.4505	เหลือง++	กลิ่นคล้ายดอกกันเกรา

* ความเข้มของสีเหลืองแปรผันตามจำนวนเครื่องหมาย +

\+ = สีเหลืองอ่อนที่สุด

++ = สีเหลืองอ่อน

+++ = สีเหลืองปานกลาง

++++ = สีเหลืองเข้ม

+++++ = สีเหลืองเข้มมาก

4.2 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของ Absolute

ผลการตรวจสอบคุณสมบัติ Absolute ของสาร โดยวิธี Gas Chromatography – Mass Spectrometry สาร absolute จากสารสกัด Hexane

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

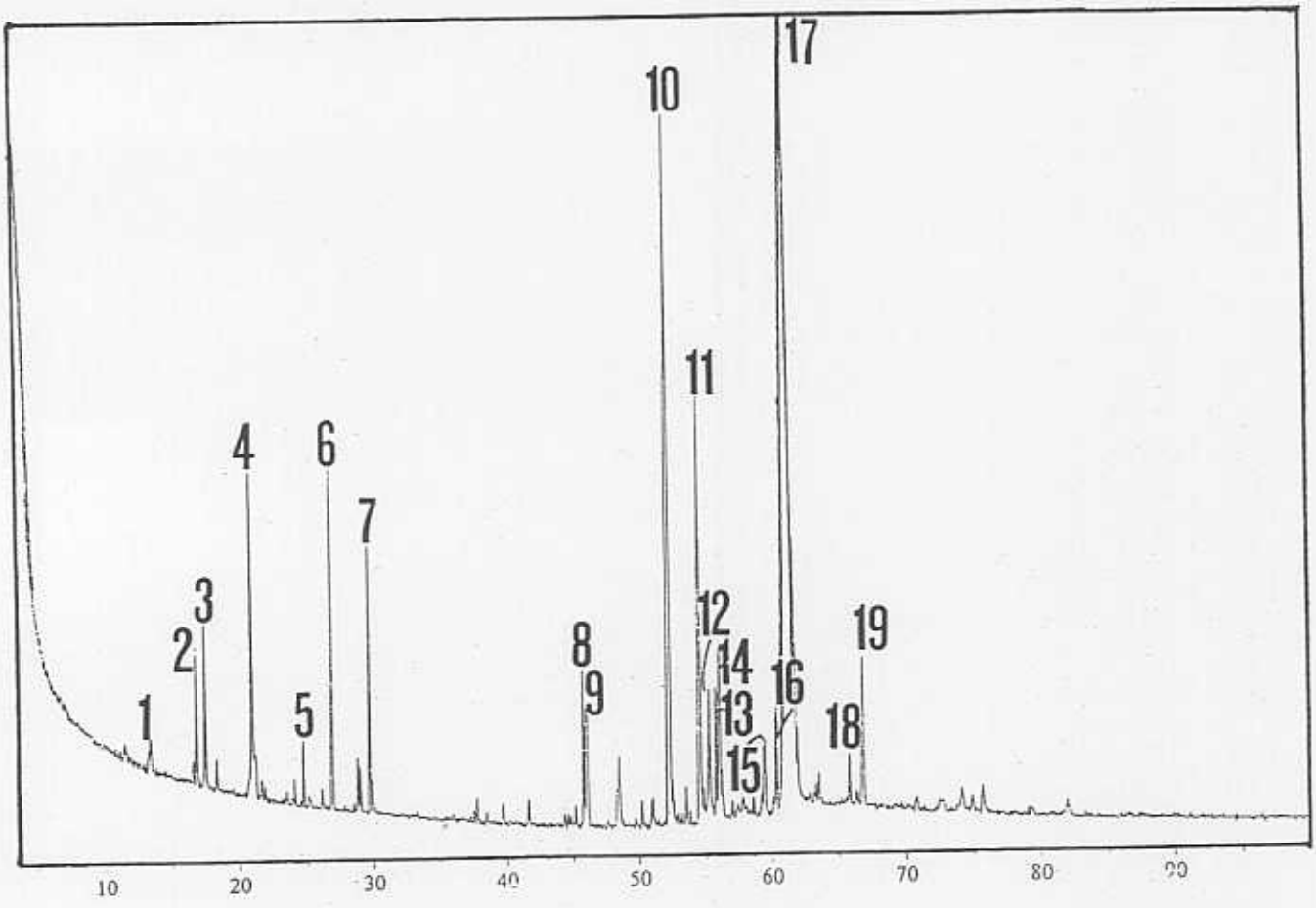
ตารางที่ 4 การตรวจสอบคุณสมบัติ Absolute ของสาร โดยวิธี Gas Chromatography – Mass Spectrometry สาร Absolute จากสารสกัด Hexane

ลำดับ	ชื่อทางเคมี	สูตรโมเลกุล	มวลโมเลกุล
1	Benzyl alcohol	C_2H_8O	108
2	Amylene Hydrate, 2-Butanol, 2-methyl tert-pentyl Alcohol	$C_5H_{12}O$	88
3	Unidentified	Unidentified	Unidentified
4	Unidentified	Unidentified	Unidentified
5	2-Propenal,-3-phenyl	C_9H_8O	132
6	Unidentified	Unidentified	Unidentified
7	Eugenol	$C_{10}H_{12}O_2$	164
8	1-Octadecanol	$C_{18}H_{38}O$	270
9	Unidentified	Unidentified	Unidentified
10	2,6,10-Dodecatrien-1-ol	$C_{15}H_{26}O$	222
11	Camphor	$C_{10}H_{16}O$	152
12	Unidentified	Unidentified	Unidentified
13	Unidentified	Unidentified	Unidentified
14	Camphor	$C_{10}H_{16}O$	152
15	Unidentified	Unidentified	Unidentified
16	Unidentified	Unidentified	Unidentified
17	2,6,10-Dodecatrien-1-ol,3,7,11-trimethyl	$C_{15}H_{26}O$	222
18	1-Octadecanol	$C_{18}H_{38}O$	270
19	Unidentified	Unidentified	Unidentified

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Full Chromatogram ของ Hexane ที่ได้จาก GC-MS



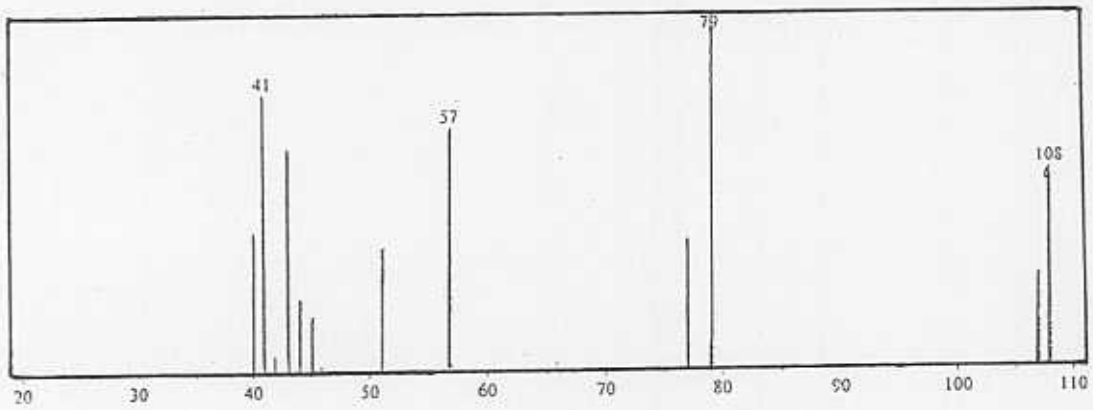
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak # : 1 Ret . Time : (13.225 – 13.617) B.G. Time : (13.924 – 14.257)

Base peak: 79.20 (896)

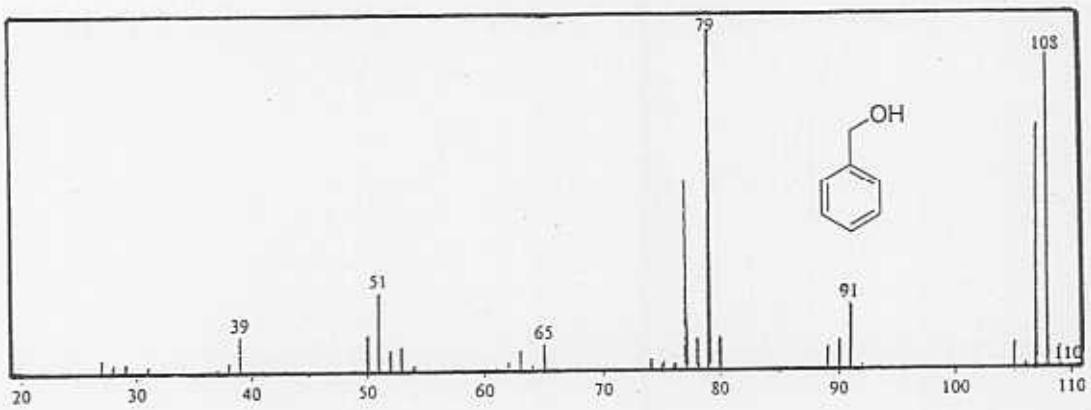


Library: NIST12.LIB

Entry : 1548 CAS : 100-51-6 Mol.Wgt : 108

Mol. Form. : C_7H_8O

Name : Benzyl alcohol



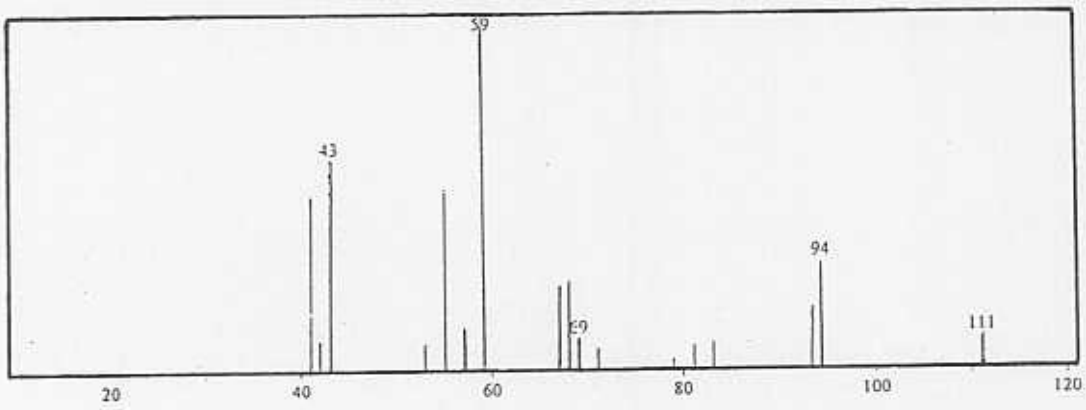
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak # : 2 Ret . Time : (16.717 – 17.117) B.G. Time : (16.010 – 16.344)

Base peak : 59.15 (2205)

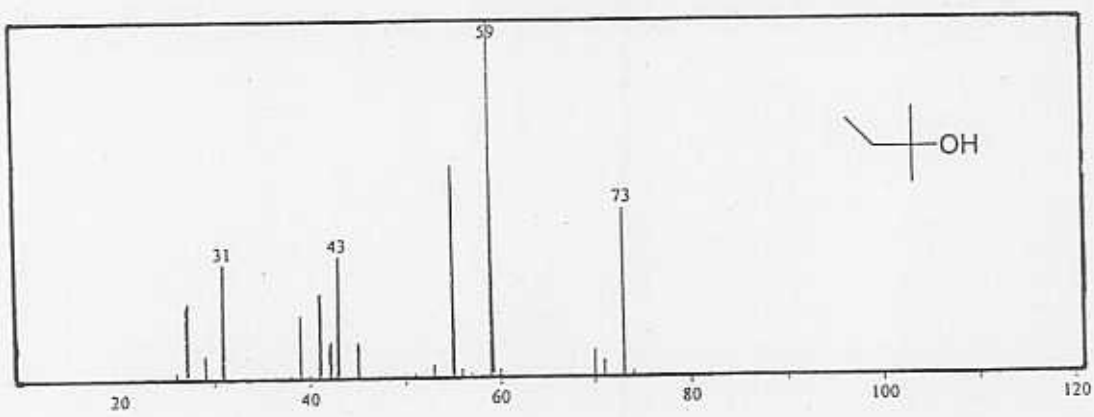


Library : NIST12.LIB

Entry : 849 CAS : 75-85-4 Mol.Wgt : 88

Mol.Form. : $C_5H_{12}O$

Name : Amylene hydrate , 2-Butanol, 2-methyl -tert-Pentyl alcohol



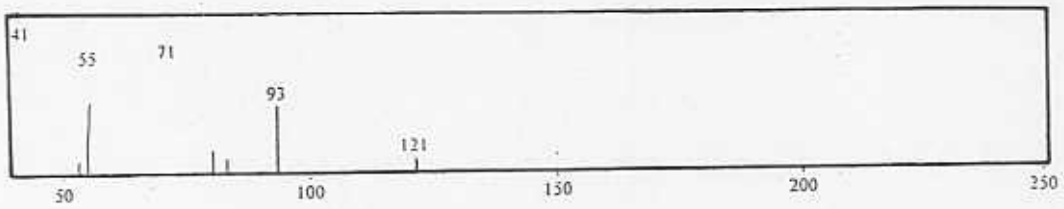
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak # : 3 Ret . Time : (17.492 – 17.750) B.G. Scan# : (1478 - 1548)

Base peak : 41.10 (3049)



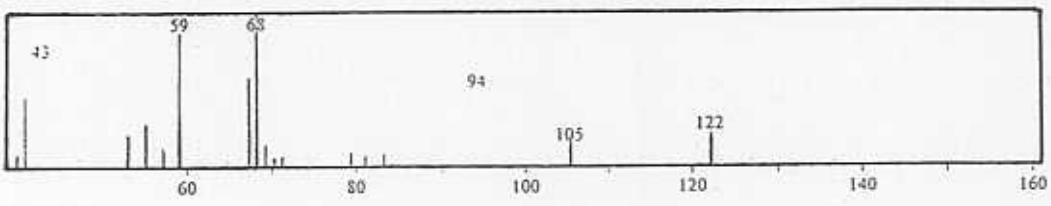
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak # : 4 Ret . Time : (20.967 – 21.125) B.G. time : (20.57 – 20.78)

Base peak : 68.20 (7298)



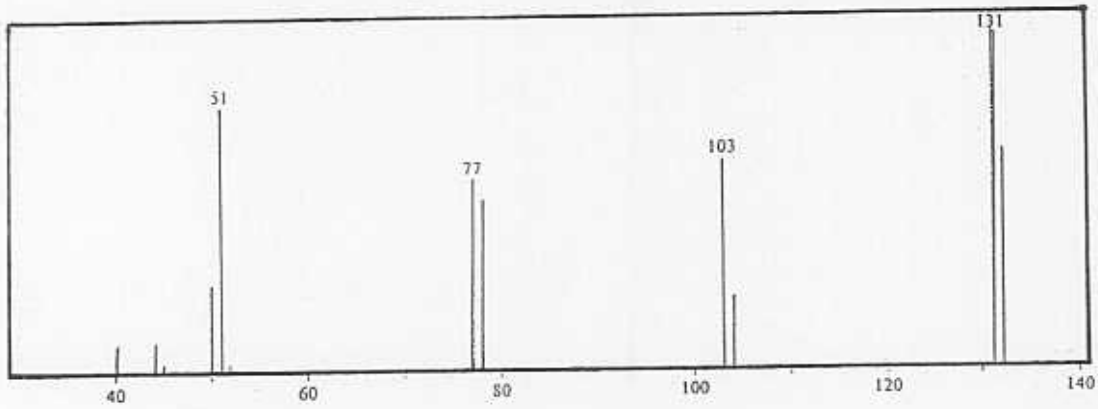
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak # : 5 Ret . Time : (24.767 – 24.850) B.G. Time : (25.454 – 25.629)

Base peak : 131.25 (3089)

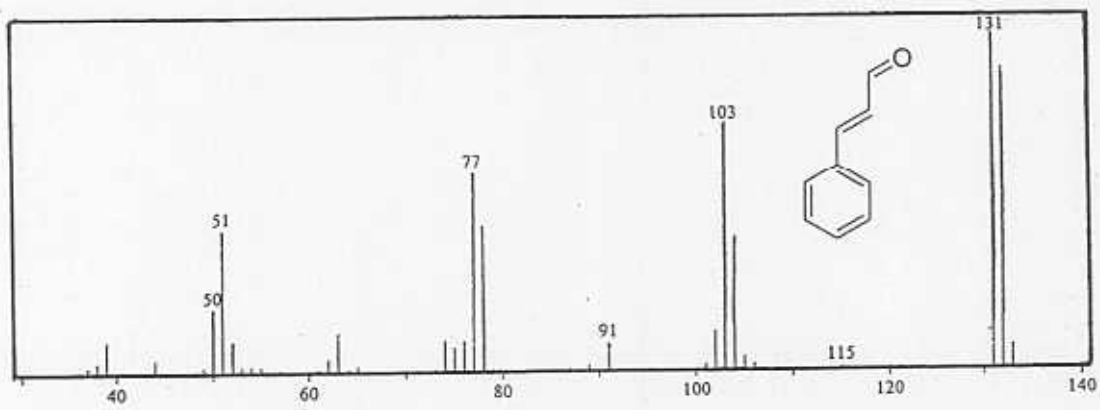


Library: NIST12.LIB

Entry : 3168 CAS : 104-55-2 Mol.Wgt : 132

Mol. Form. : C_9H_8O

Name: 2-Propenal, 3-phenyl



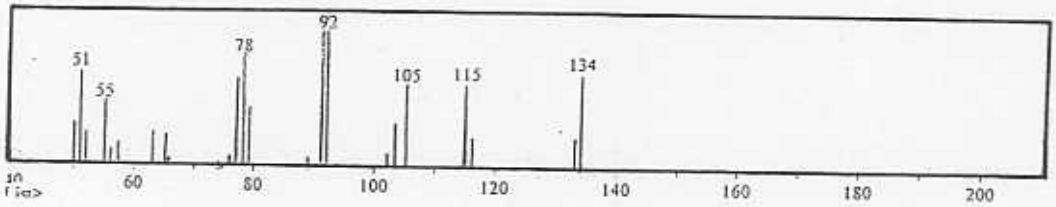
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak #: 6 Ret. Time: (26.917 – 27.008) B.G. Scan: (2860 – 2876)

Base peak: 92.25 (9060)



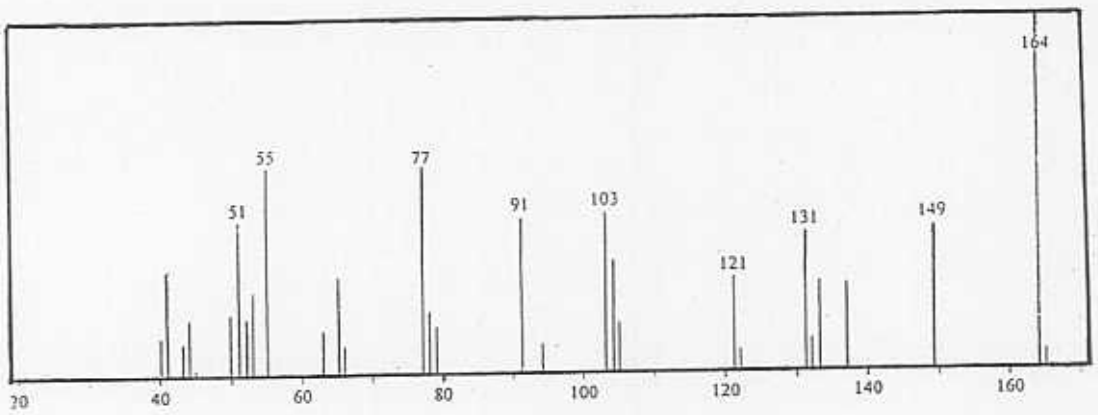
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak #: 7 Ret. Time: (29.700 – 29.825) B.G. Time: (29.409 – 29.549)

Base peak: 164.25 (6312)

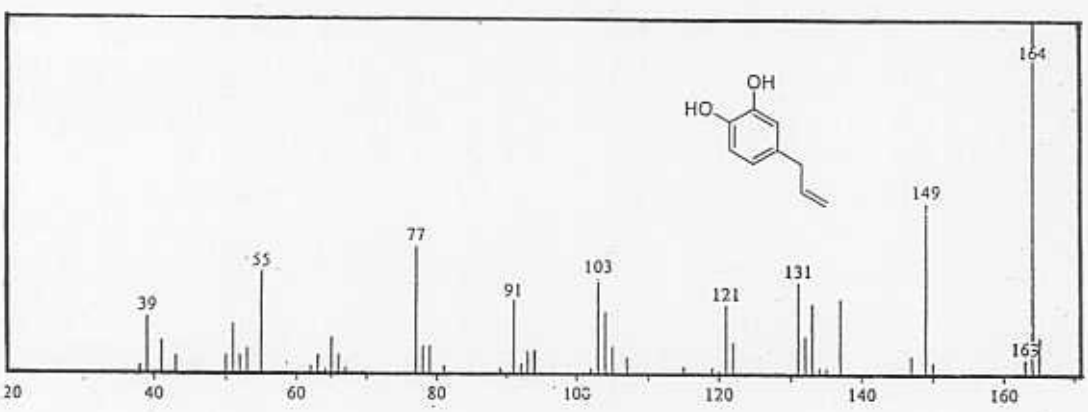


Library: NIST12.LIB

Entry : 5613 CAS : 97-53-0 Mol.Wgt : 164

Mol. Form. : $C_{10}H_{12}O_2$

Name : Eugenol



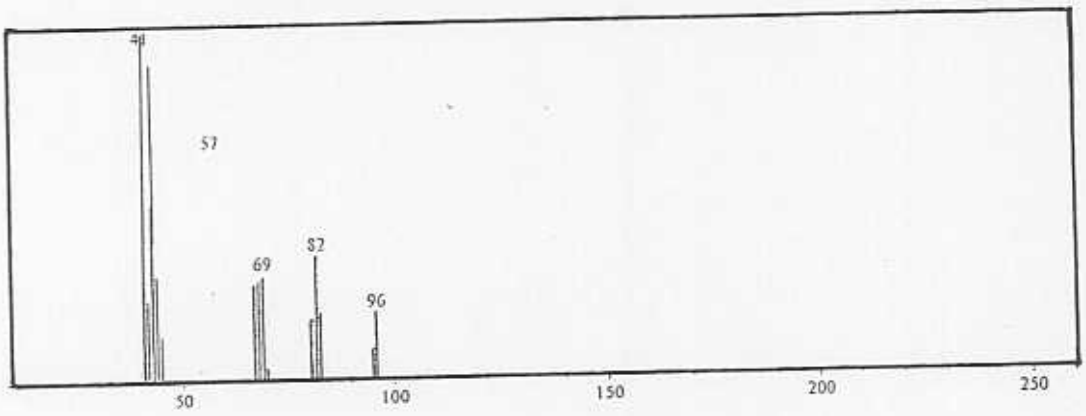
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak #: 8 Ret. Time: (45.808 – 45.875) B.G. Time: (45.442 – 45.620)

Base peak: 41.10 (5842)

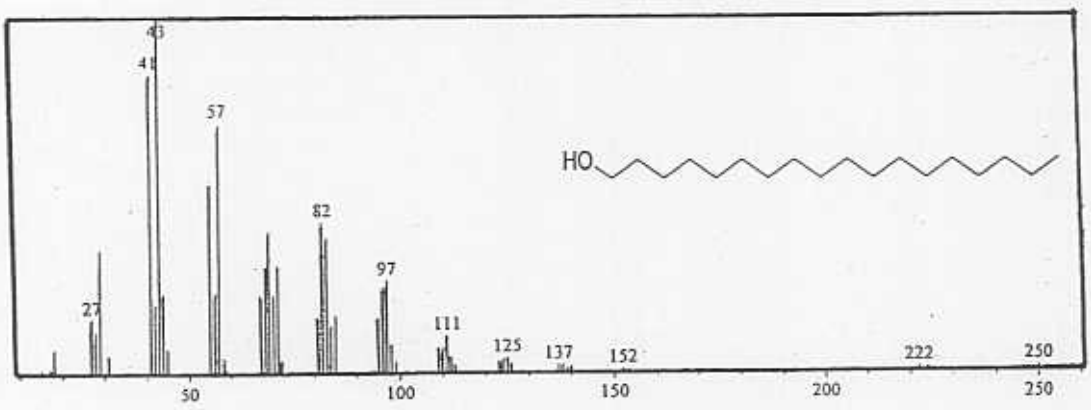


Library: NIST12.LIB

Entry : 9792 CAS : 112-92-5 Mol.Wgt : 270

Mol.Form. : $C_{18}H_{38}O$

Name : 1-Octadecanol



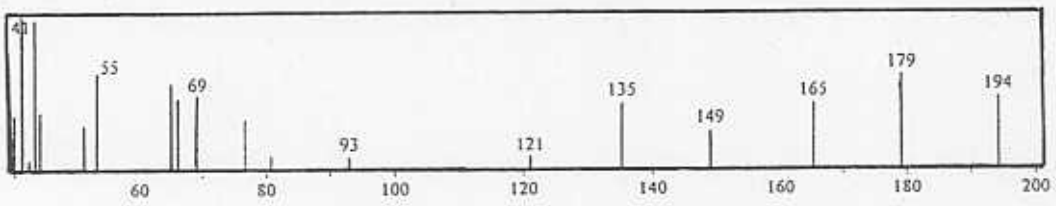
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak # : 9 Ret . Time : (45.967 – 46.250) B.G. Time : (5157 – 5170)

Base peak : 41.10 (2364)



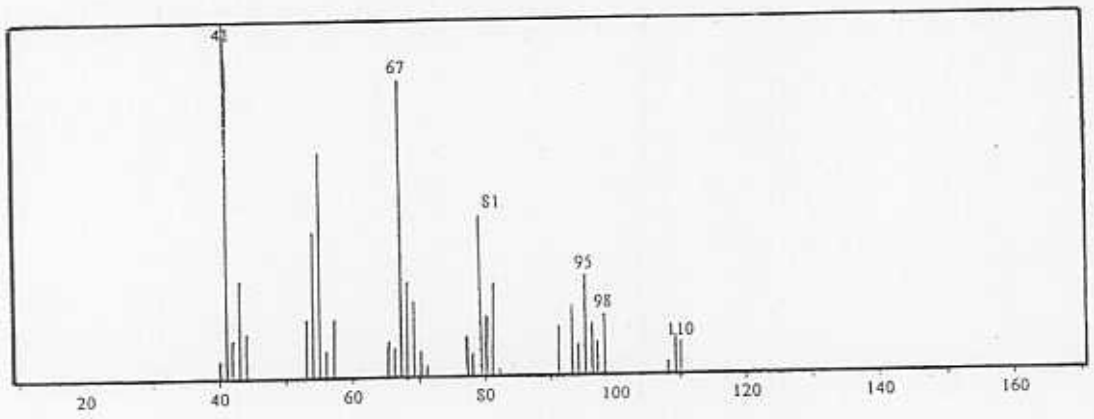
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak # : 10 Ret . Time: (52.175 – 52.217) B.G. Time: (51.845 – 51.955)

Base peak: 41.10 (16322)

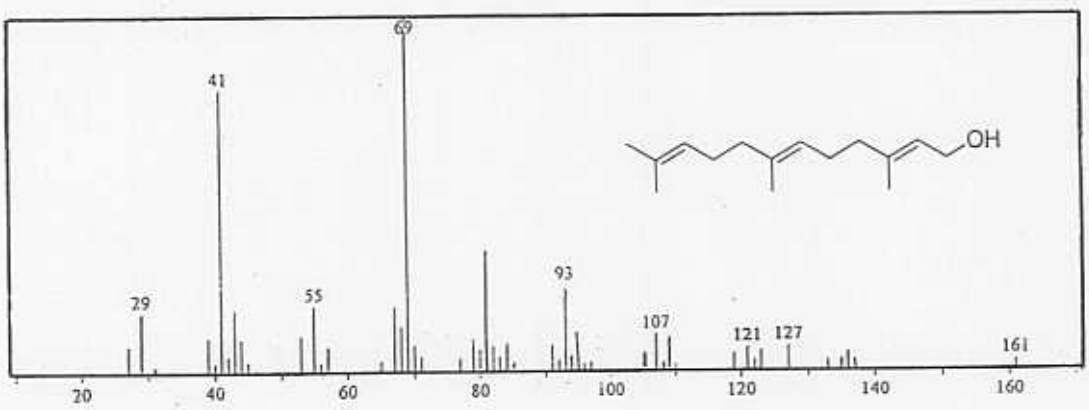


Library: NIST12.LIB

Entry : 8392 CAS : 4602-84-0 Mol.Wgt : 222

Mol. Form. : $C_{15}H_{26}O$

Name: 2,6,10-Dodecatrin-1-ol



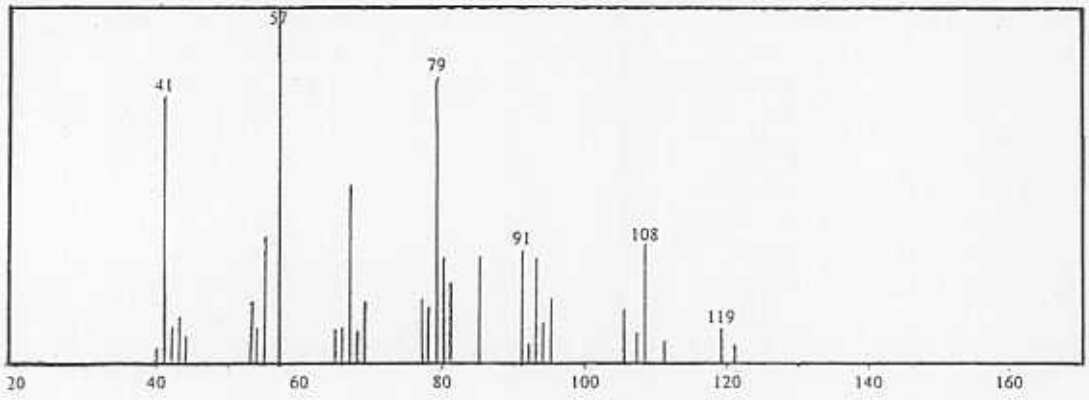
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak # : 11 Ret . Time: (54.608 – 54.683) B.G. Time: (54.848 – 54.901)

Base peak: 57.15 (11618)

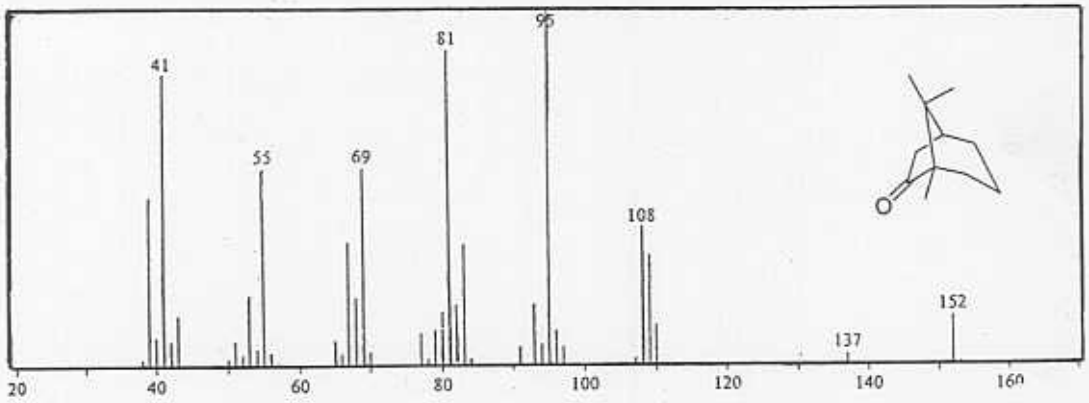


Library: NIST12.LIB

Entry : 4745 CAS : 76-22-2 Mol.Wgt : 152

Mol.Form. : $C_{10}H_{16}O$

Name : Camphor



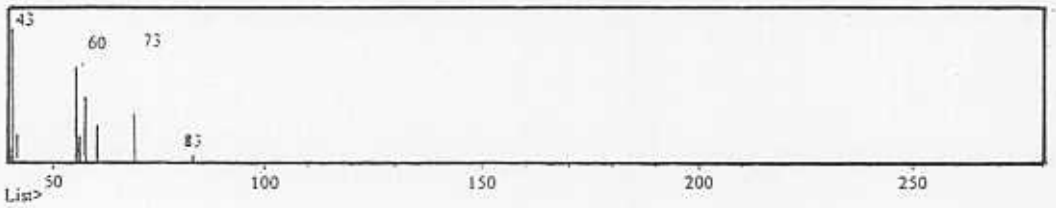
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak # : 12 Ret . Time : (55.275 – 55.383) B.G. Scan : (6185 – 6198)

Base peak : 43.15 (3414)



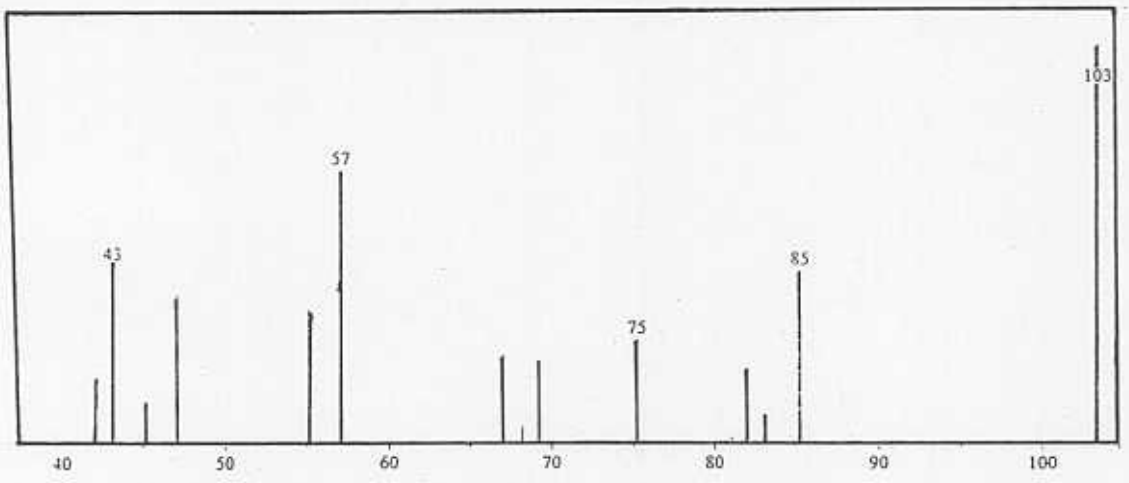
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak # : 13 Ret . Time: (55.758 – 55.850) B.G. Scan: (6238 – 6260)

Base peak: 103.30 (5250)



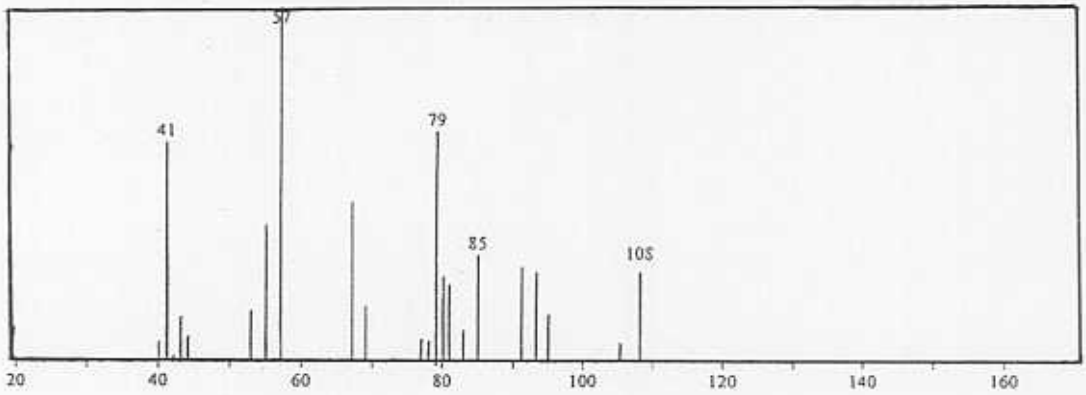
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak #: 14 Ret. Time: (56.075 – 56.142) B.G. Time: (55.587 – 55.658)

Base peak: 57.15 (7170)

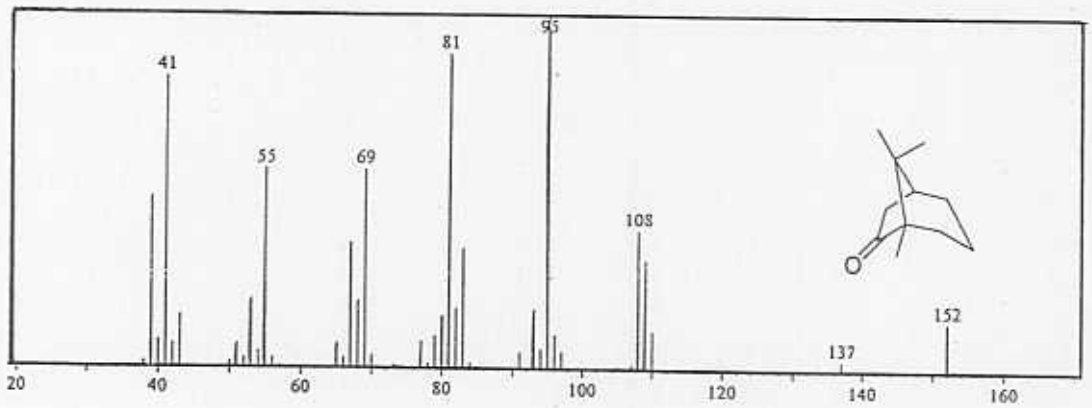


Library: NIST12.LIB

Entry: 4745 CAS: 76-22-2 Mol.Wgt: 152

Mol. Form. : $C_{10}H_{16}O$

Name: Camphor



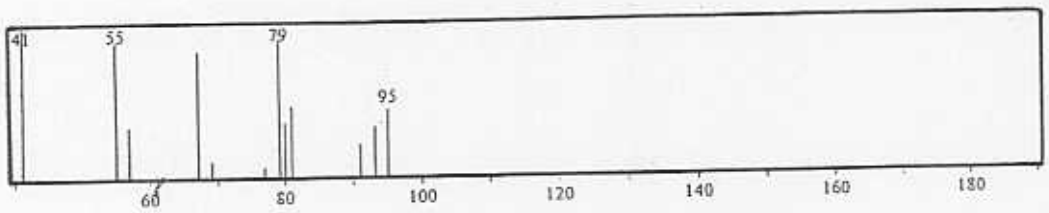
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak #: 15 Ret. Time: (59.42 92 – 59.567) B.G. Scan: (6753 – 6775)

Base peak: 41.10 (2704)



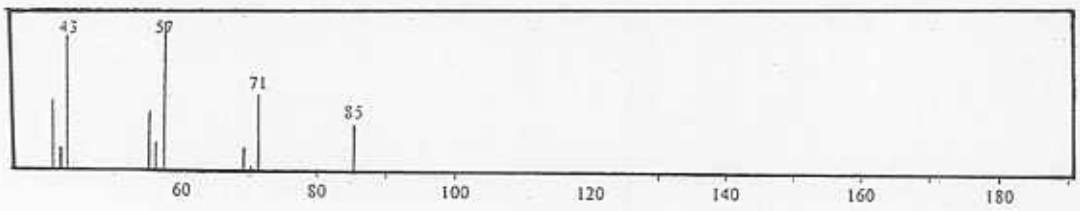
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak #: 16 Ret. Time: (60.342 – 60.433) B.G. Scan#: (6763 – 6777)

Base peak: 57.20 (5905)



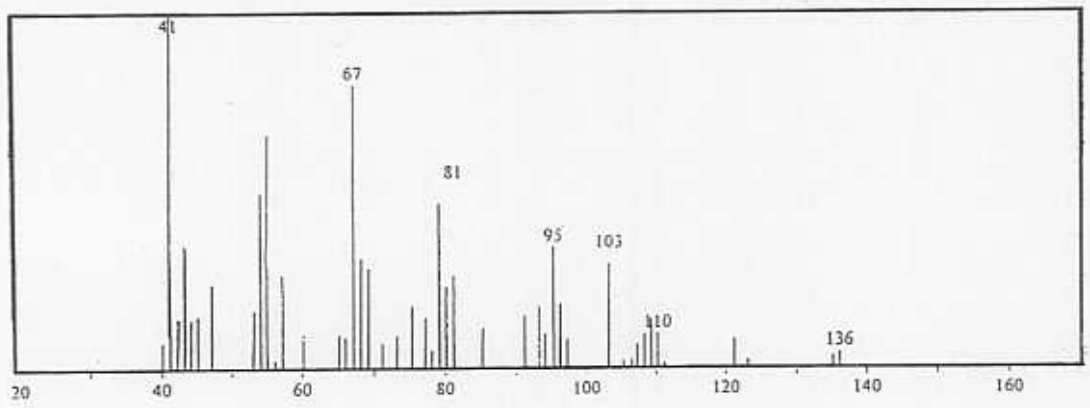
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak #: 17 Ret. Time: (60.967 – 61.125) B.G. time: (60.571 – 60.670)

Base peak: 41.10 (13960)

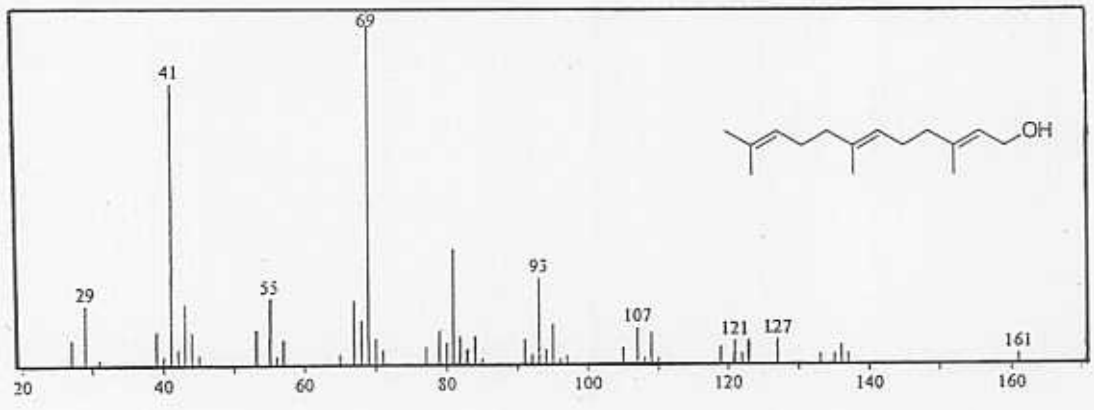


Library: NIST62.LIB

Entry: 8392 CAS: 4602-84-0 Mol.Wgt: 222

Mol. Form. : $C_{15}H_{26}O$

Name: 2, 6, 10-Dodecatrien-1ol, 3, 7, 11-trimethyl



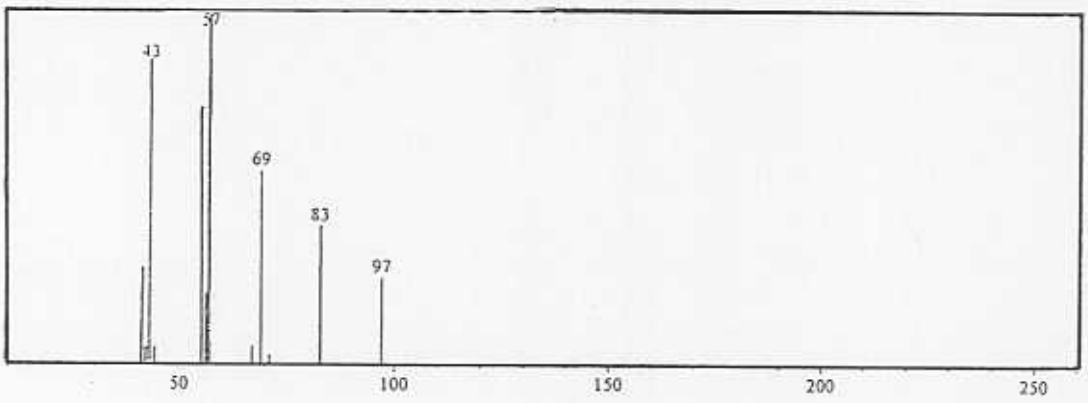
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak #: 18 Ret. Time: (65.742 – 65.925) B.G. Time: (67.441-67.809)

Base peak: 57.20 (1623)

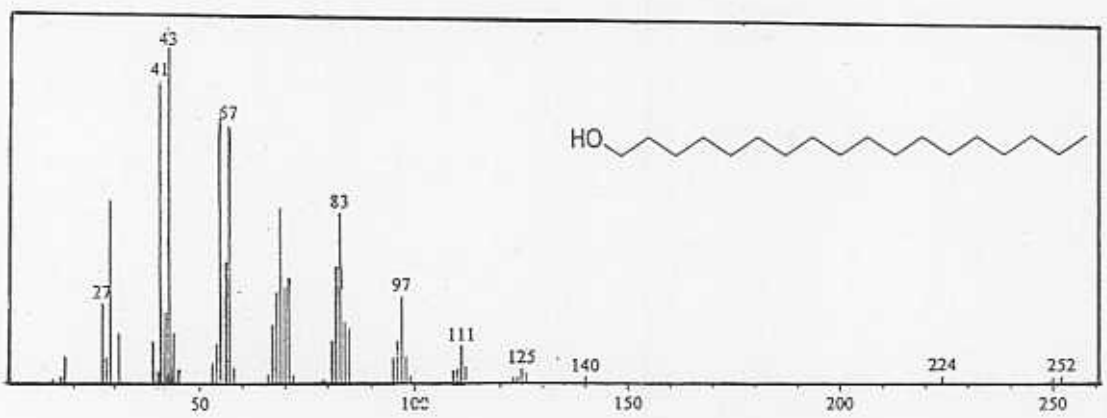


Library: NIST12.LIB

Entry : 9791 CAS : 122-92-5 Mol.Wgt : 270

Mol.Form. $C_{18}H_{38}O$

Name: 1-Octadecanol



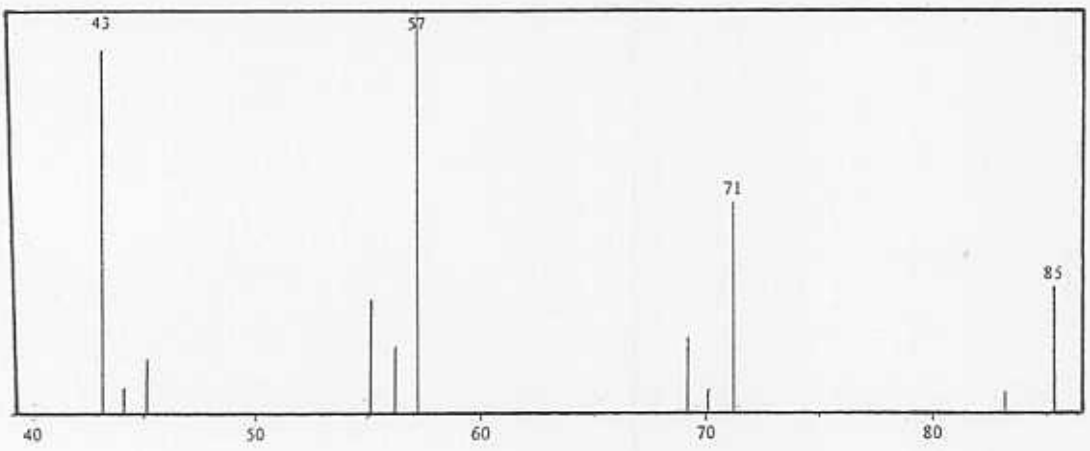
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Hexane)

Mass peak #: 19 Ret. Time: (66.833 – 66.975) B.G. Time: (7672-7717)

Base peak: 57.20 (6717)



Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ผลการตรวจสอบคุณสมบัติ Absolute ของสาร โดยวิธี Gas Chromatography – Mass Spectrometry สาร Absolute จากสารสกัด Petroleum Ether

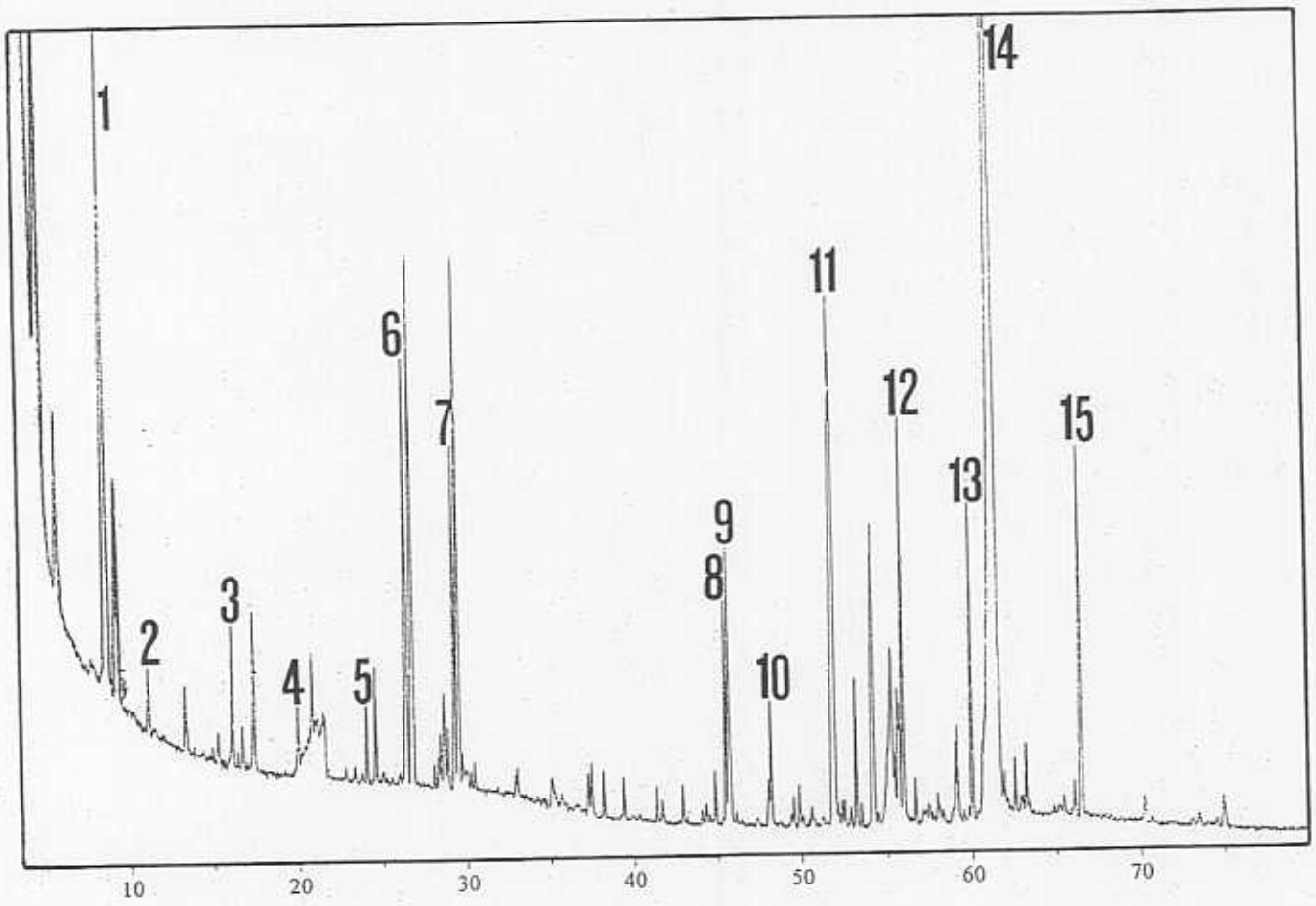
ตารางที่ 5 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติ Absolute ของสาร โดยวิธี Gas Chromatography – Mass Spectrometry สาร Absolute จาก Petroleum Ether

ลำดับ	ชื่อทางเคมี	สูตรโมเลกุล	มวลโมเลกุล
1	Methyl Isobotyl Keton, 2-Penta none,4-methyl -Hexone Dimethadione, 2,4-Oxazolidinedione	$C_6H_{12}O$ $C_5H_7NO_3$	100 129
2	Benzyl alcohol	C_2H_8O	108
3	2,6,10-Dodecatrien-1-ol	$C_{15}H_{26}O$	222
4	Benzoic Acid	$C_7H_6O_2$	122
5	2-Propenal,-3-phenyl	C_9H_8O	132
6	Unidentified	Unidentified	Unidentified
7	Eugenol	$C_{10}H_{12}O_2$	164
8	1-Octadecanol	$C_{18}H_{38}O$	270
9	2,6,10-Dodecatrien-1-ol,3,7,11-trimethyl	$C_{15}H_{26}O$	222
10	1-Octadecanol	$C_{18}H_{38}O$	270
11	2,6,10-Dodecatrien-1-ol,3,7,11-trimethyl	$C_{15}H_{26}O$	222
12	Unidentified	Unidentified	Unidentified
13	Unidentified	Unidentified	Unidentified
14	Oleyl Alcohol	$C_{18}H_{36}O$	268
15	Squalane, Tetracosane, 2,6,1,15,19,23-Hexamethyl- Cosbiol	$C_{30}H_{62}$	422

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Full Chromatogram ของ Petroleum Ether ที่ได้จาก GC-MS



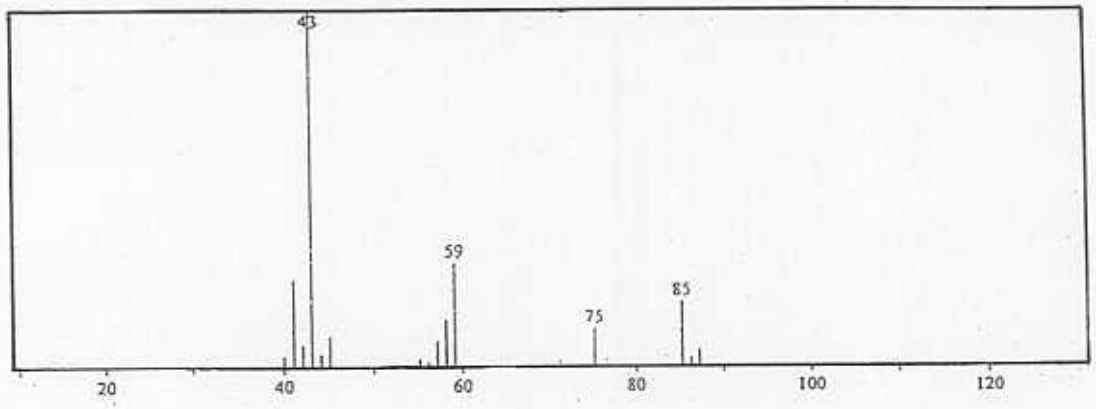
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (petroleum ether)

Mass peak #: 1 Ret. Time: (8.542 – 8.767) B.G. Time: (7.878-8.113)

Base peak: 43.10 (50210)

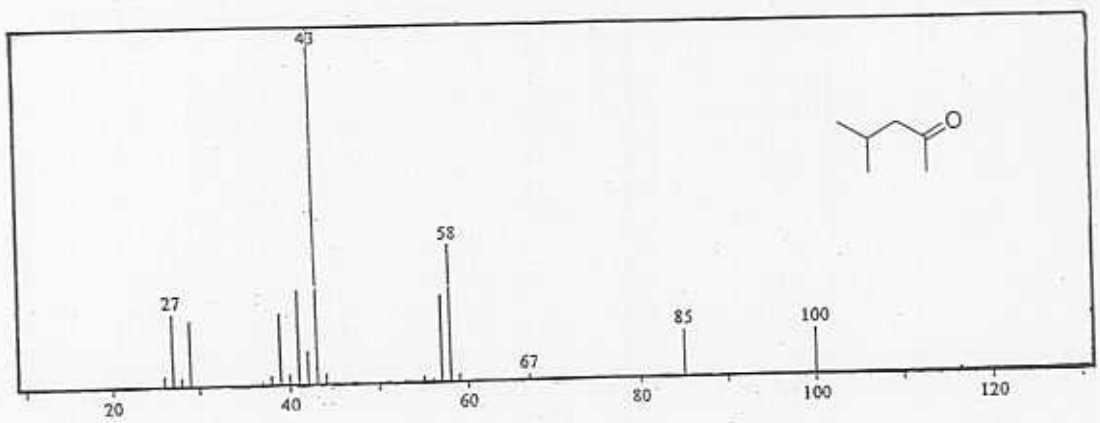


Library: NIST12.LIB

Entry: 1526 CAS: 108-10-1 Mol.Wgt: 100

Mol. Form. : $C_6H_{12}O$

Name: Methyl Isobutyl Ketone, 2-Pentanone, 4-methyl-Hexanone



Ubon Rajathanee University

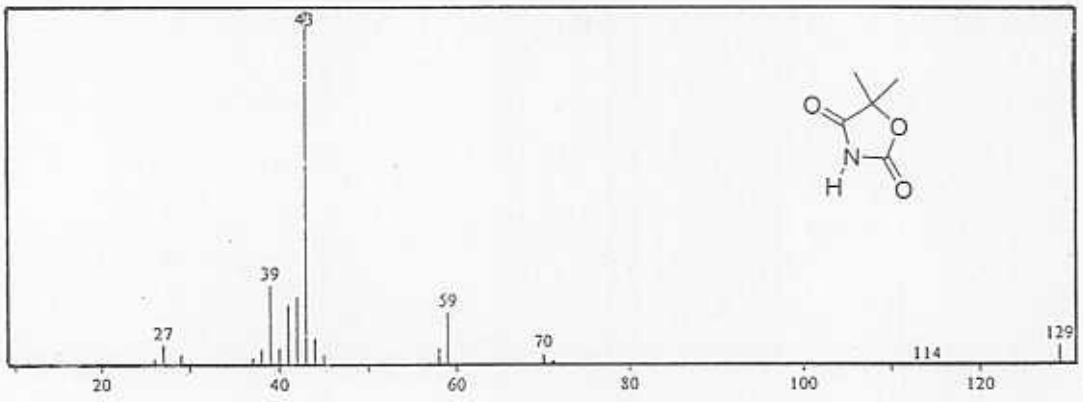
Ubon Rajathanee University

Library: NIST12.LIB

Entry: 5199 CAS: 695-53-4 Mol.Wgt: 129

Mol. Form. : $C_5H_7NO_3$

Name: Dimethadione 2, 4-Oxazolidinedione



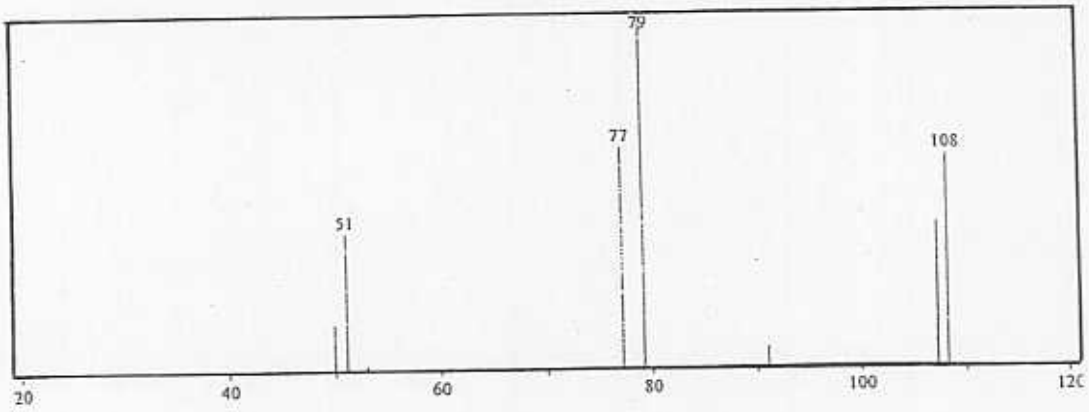
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (petroleum ether)

Mass peak #: 2 Ret. Time: (10.958 – 11.392) B.G. Time: (10.407-10.758)

Base peak: 79.20 (1509)

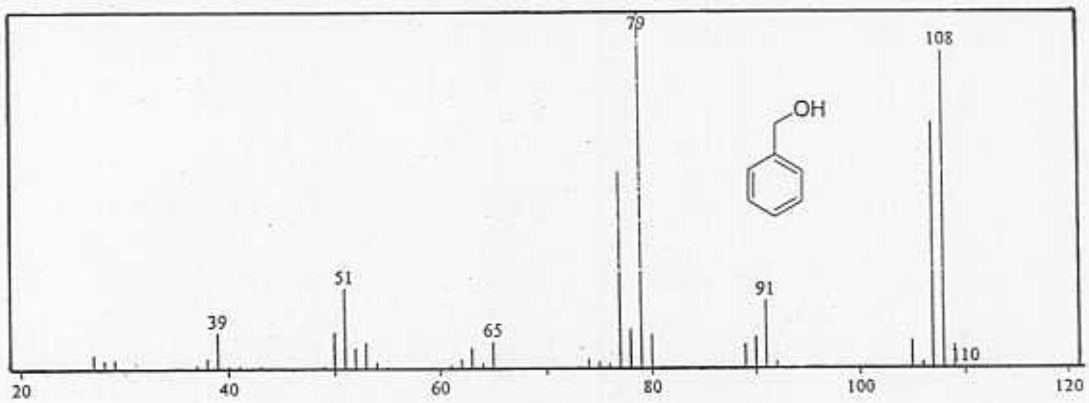


Library: NIST62.LIB

Entry: 1548 CAS: 100-51-6 Mol.Wgt: 108

Mol. Form. : C_7H_8O

Name: Benzyl Alcohol



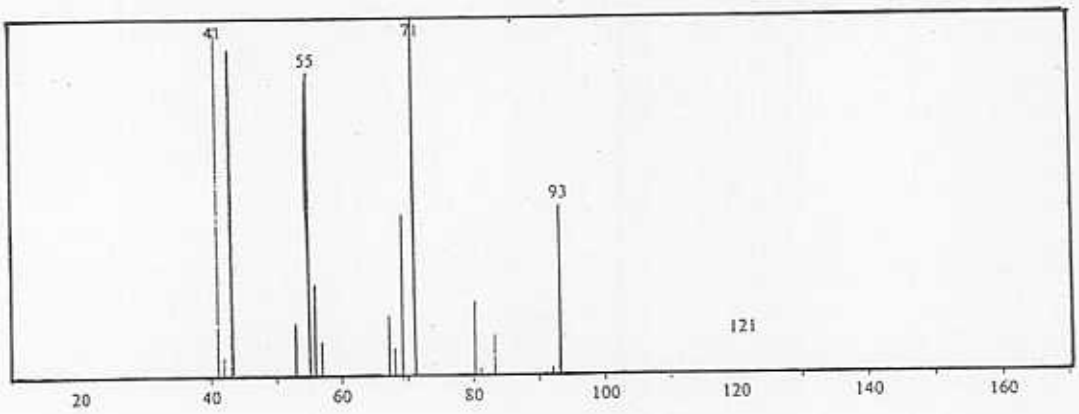
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (petroleum ether)

Mass peak #: 3 Ret. Time: (17.283 – 17.700) B.G. Time: (15.592-15.896)

Base peak: 71.20 (1956)

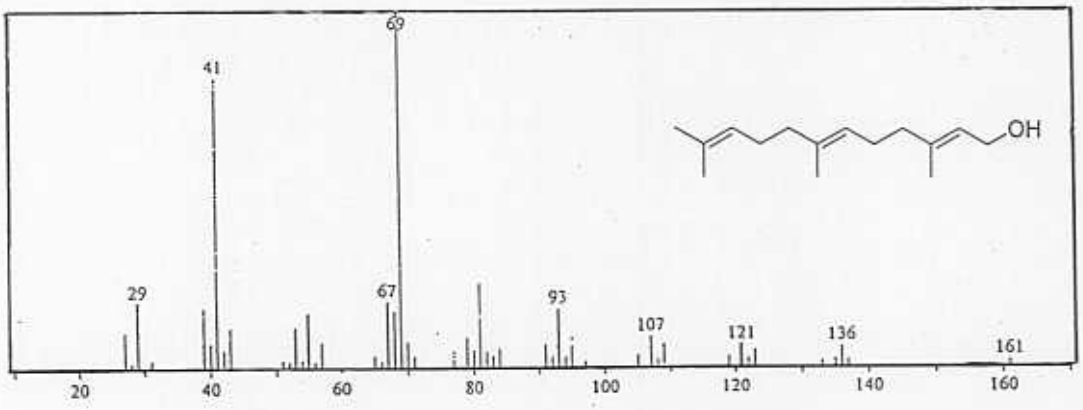


Library: NIST12.LIB

Entry: 8394 CAS: 4602-84- Mol.Wgt: 222

Mol. Form. : $C_{15}H_{26}O$

Name: 2, 6, 10-Dodecatrien -1-ol



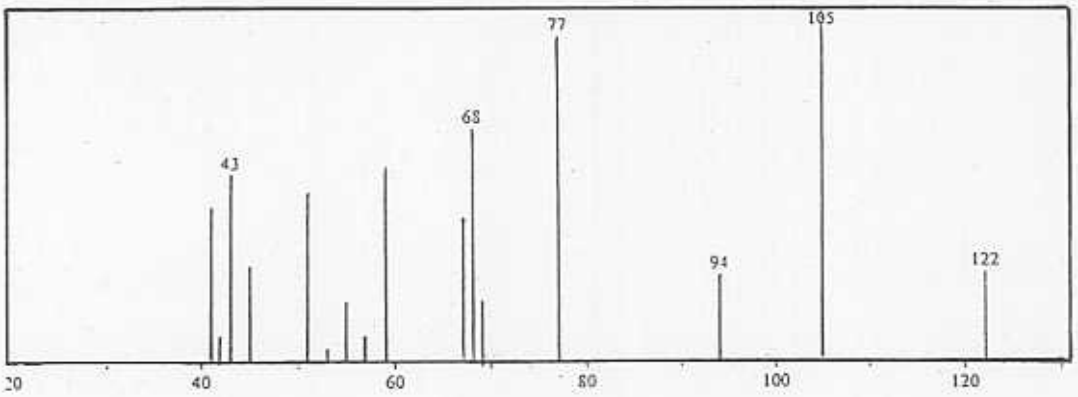
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Petroleum ether)

Mass peak #: 4 Ret. Time: (19.833 – 20.225) B.G. Time: (19.300 – 19.517)

Base peak: 105.05 (1173)

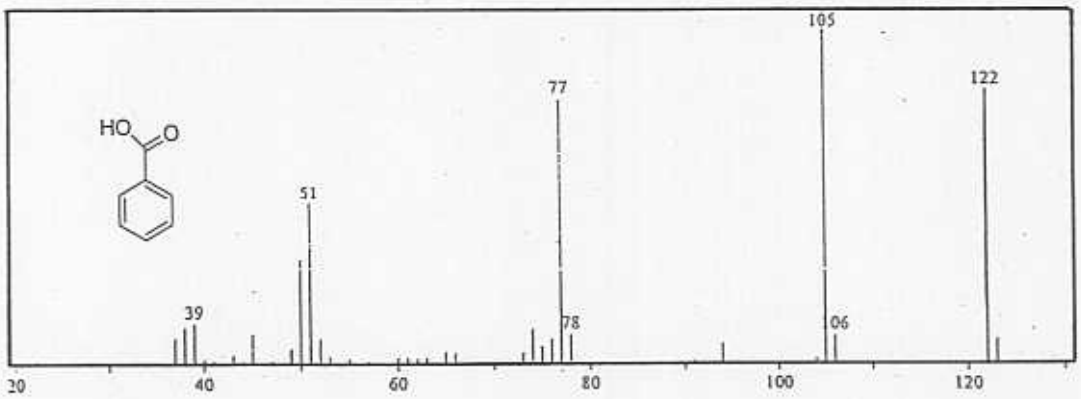


Library: NIST12.LIB

Entry: 2414 CAS: 65-85-0 Mol.Wgt: 122

Mol. Form. : $C_7H_6O_2$

Name: Benzoic acid



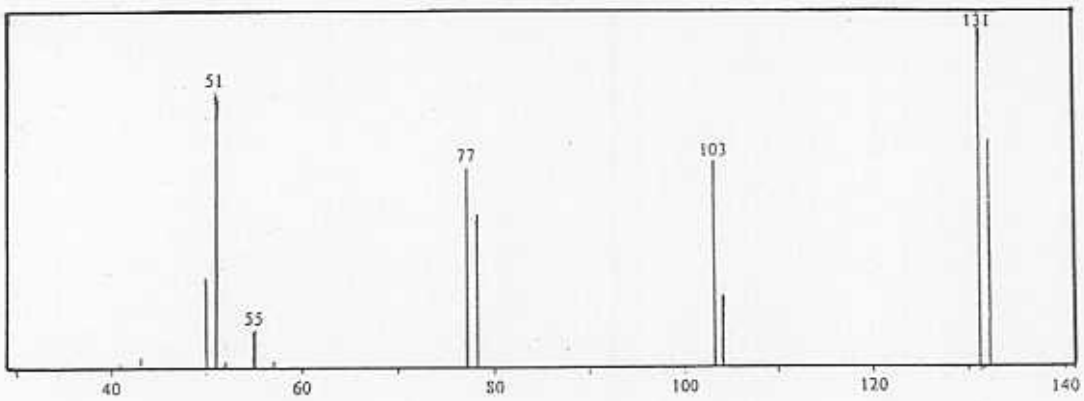
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Petroleum ether)

Mass peak #: 5 Ret. Time: (23.975 – 24.267) B.G. Time: (23.537 – 23.681)

Base peak: 131.25 (1682)

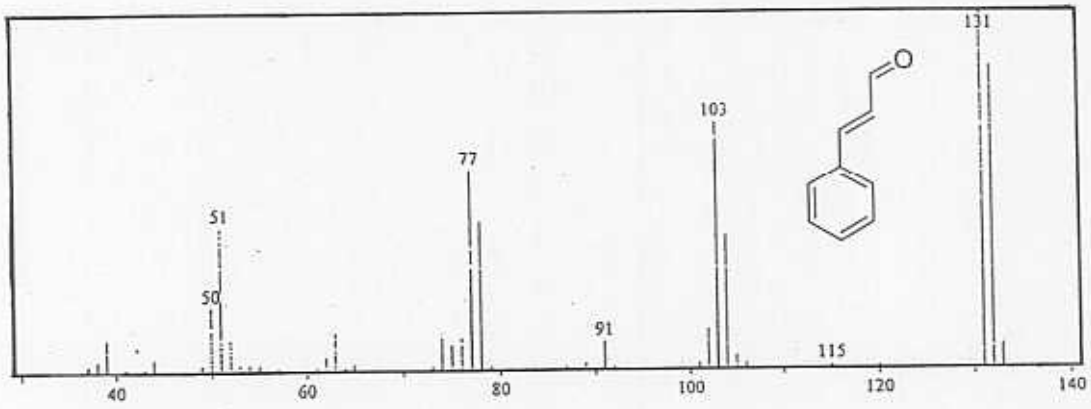


Library: NIST12.LIB

Entry: 3168 CAS: 104-55-2 Mol.Wgt: 132

Mol. Form. : C_9H_8O

Name: 2-Propenal, 3-phenyl



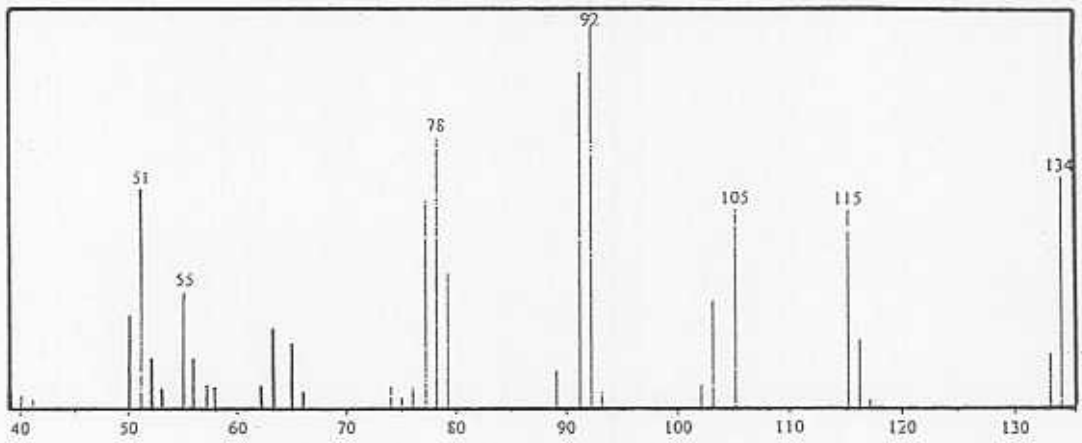
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Petroleum ether)

Mass peak #: 6 Ret. Time: (26.358 – 26.567) B.G. Scan: (2691-2715)

Base peak: 92.25 (8447)



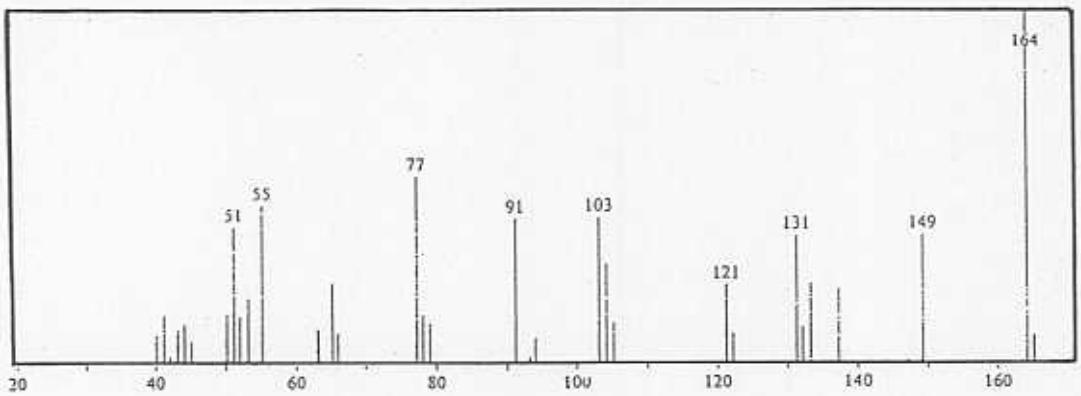
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Petroleum ether)

Mass peak #: 7 Ret. Time: (29.233 – 29.433) B.G. Time: (30.191 – 30.314)

Base peak: 164.25 (6572)

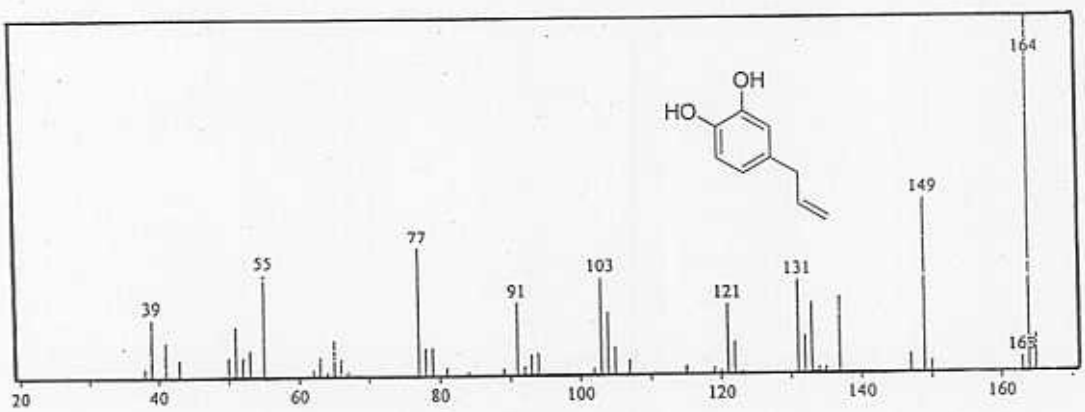


Library: NIST12.LIB

Entry: 5613 CAS: 97-53-0 Mol.Wgt: 164

Mol. Form. : $C_{10}H_{12}O_2$

Name: Eugenol



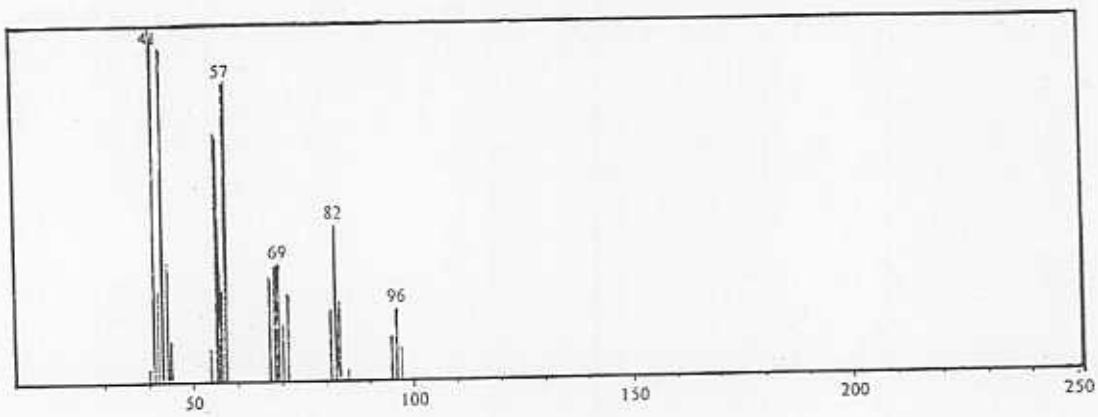
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Petroleum ether)

Mass peak #: 8 Ret. Time: (45.450-45.600) B.G. Time: (45.194 – 45.322)

Base peak: 41.15 (5170)

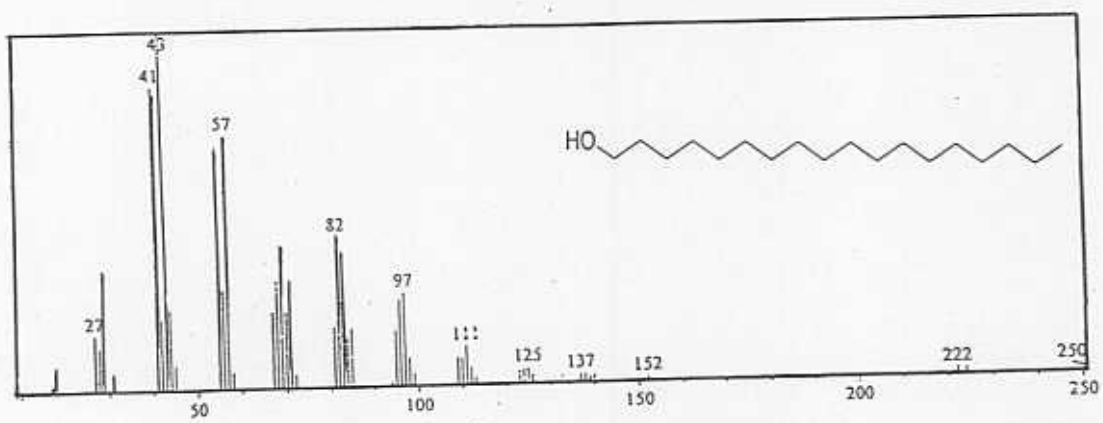


Library: NIST12.LIB

Entry : 9792 CAS : 112-92-5 Mol.Wgt : 270

Mol.Form. : $C_{18}H_{38}O$

Name : 1-Octadecanol



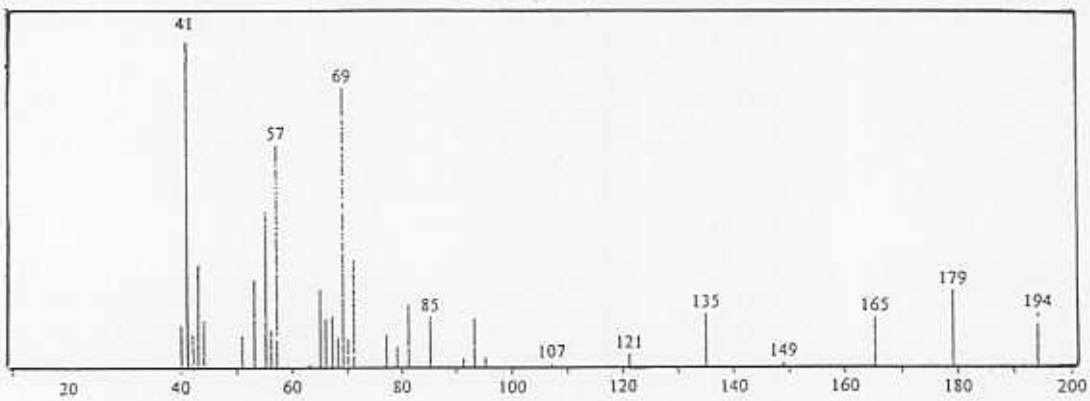
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Petroleum ether)

Mass peak # : 9 Ret . Time : (45.667 – 45.908) B.G. Time : (45.187 – 45.308)

Base peak : 41.15 (5520)

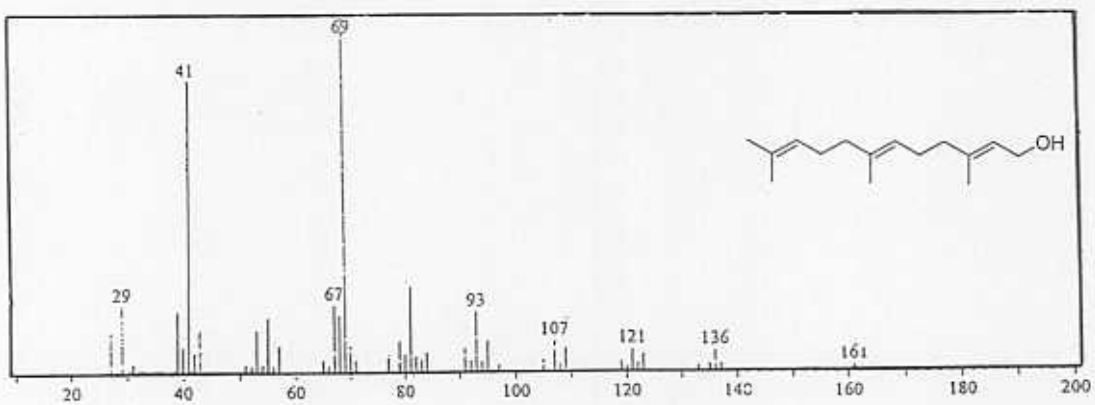


Library : NIST12.LIB

Entry : 8394 CAS : 4602-84-0 Mol.Wgt : 222

Mol.Form. : $C_{15}H_{26}O$

Name : 2,6, 10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl



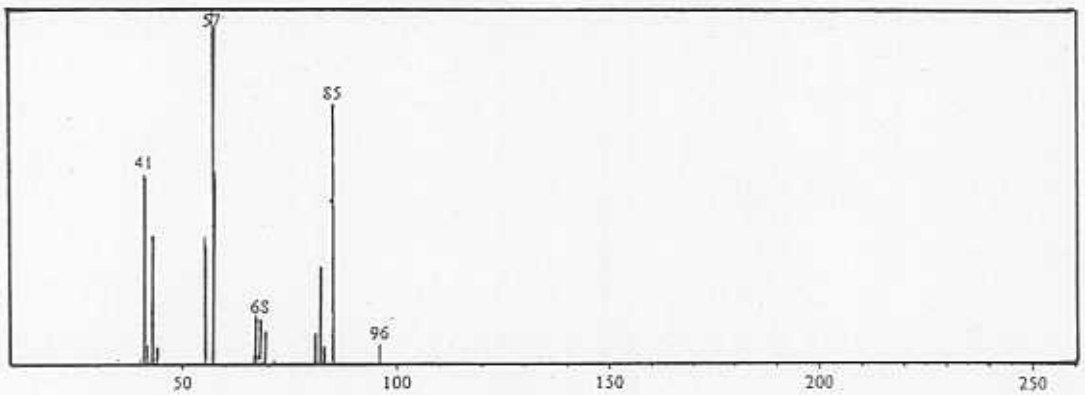
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (petroleum ether)

Mass peak # : 10 Ret . Time : (48.158 – 48.317) B.G. Time : (47.715-47.865)

Base peak : 57.15 (4795)

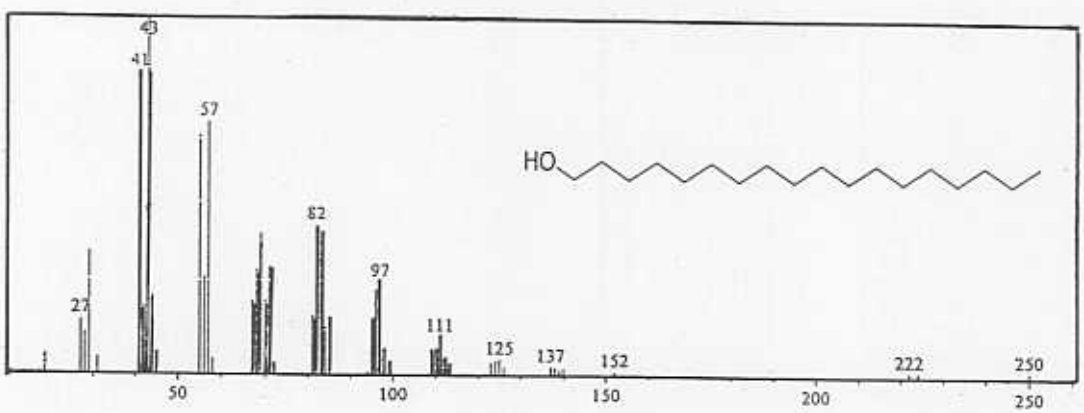


Library: NIST12.LIB

Entry: 9792 CAS: 112-92-5 Mol.Wgt: 270

Mol. Form. : $C_{18}H_{38}O$

Name: 1-Octadecanol



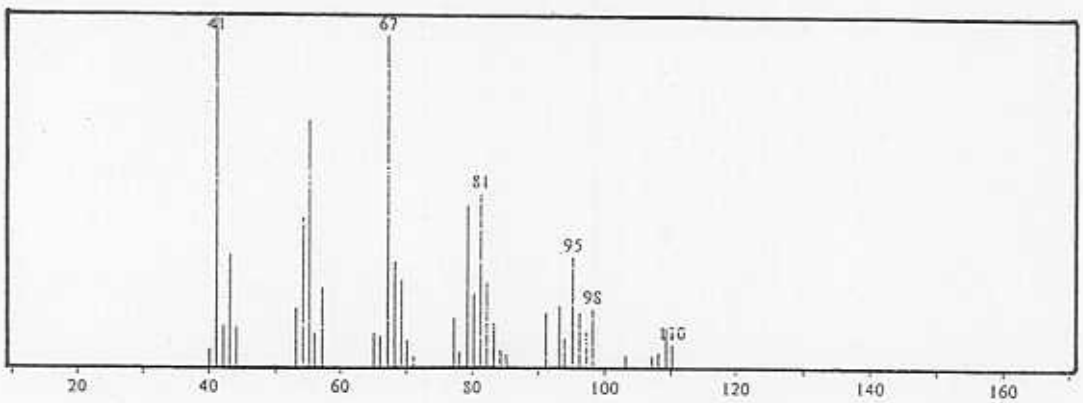
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Petroleum ether)

Mass peak #: 11 Ret. Time: (51.858 – 51.967) B.G. Time: (51.379 – 51.570)

Base peak: 41.15 (15722)

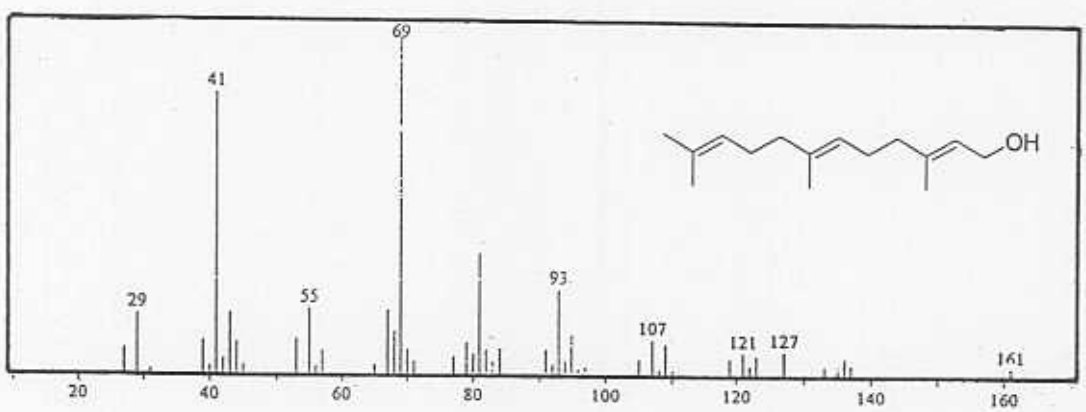


Library: NIST12.LIB

Entry : 8392 CAS : 4602-84-0 Mol.Wgt : 222

Mol.Form. : $C_{15}H_{26}O$

Name : 2,6,10-Dodecatrien-1-ol,3,7,11-trimethyl



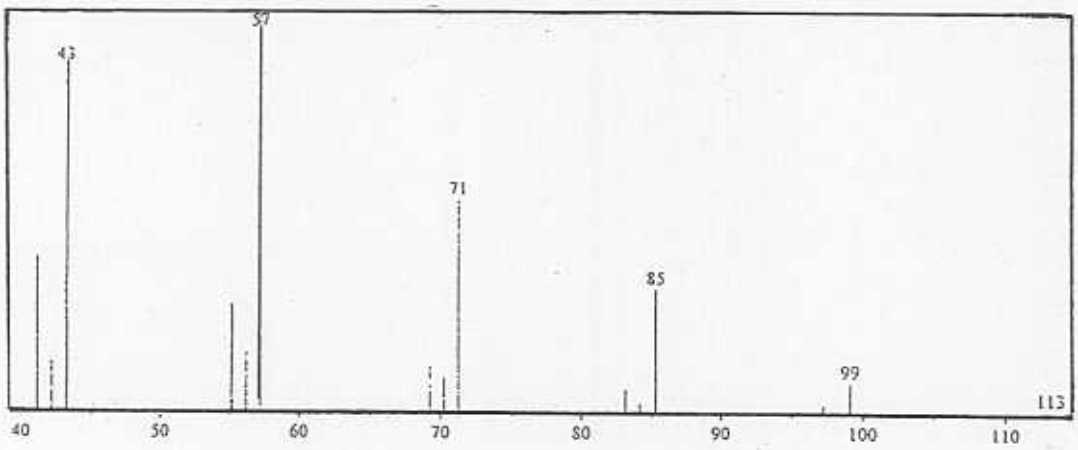
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Petroleum etherr)

Mass peak # : 13 Ret . Time : (59.958 – 60.150) B.G. Scan : (6718 - 6745)

Base peak : 57.20 (10127)



Ubon Rajathanee University

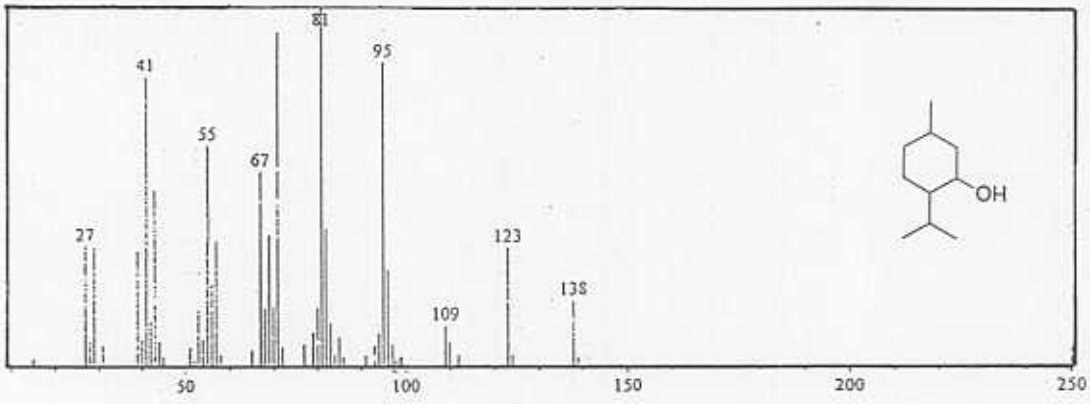
Ubon Rajathanee University

Library : NIST62.LIB

Entry : 11538 CAS : 2216-51-5 Mol.Wgt : 156

Mol.Form. : $C_{10}H_{20}O$

Name : L-(-)-Menthol



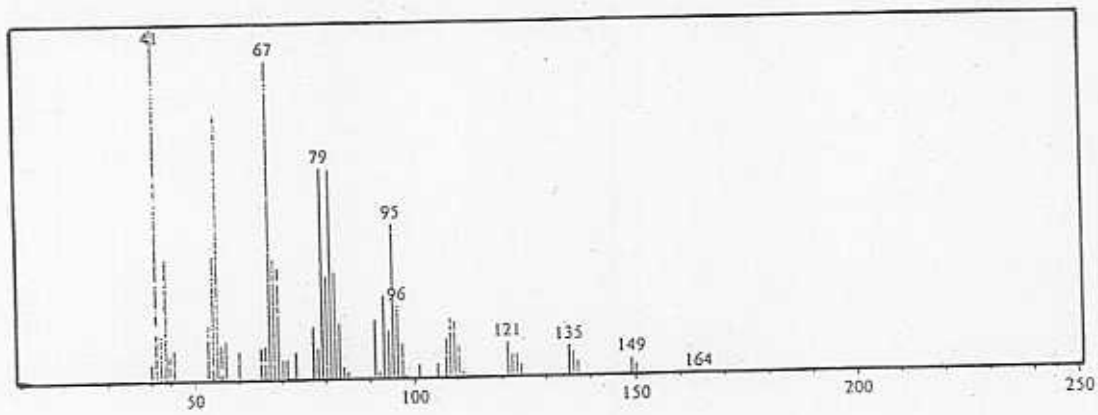
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (Petroleum ether)

Mass peak # : 14 Ret . Time : (61.267 – 61.700) B.G. Time : (62.007 – 62.235)

Base peak : 41.15 (21280)

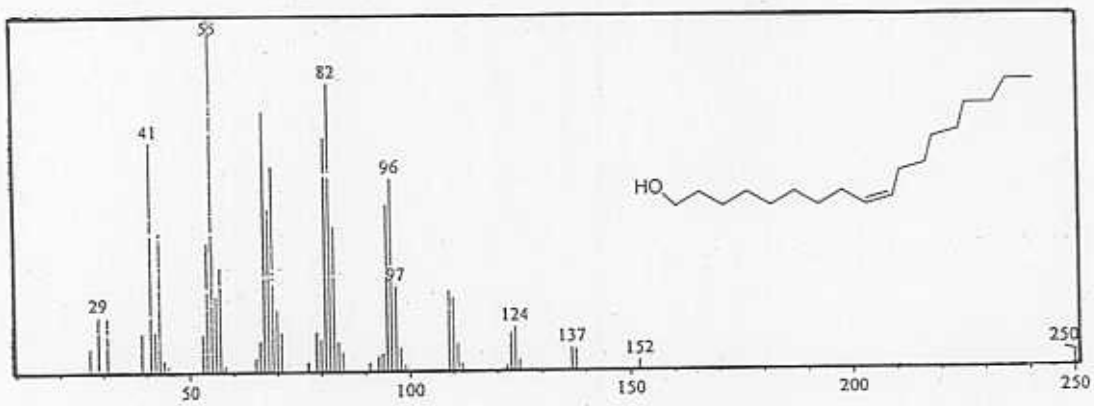


Library : NIST12.LIB

Entry : 9709 CAS : 143-28-2 Mol.Wgt : 268

Mol.Form. : $C_{18}H_{36}O$

Name : Oleyl alcohol



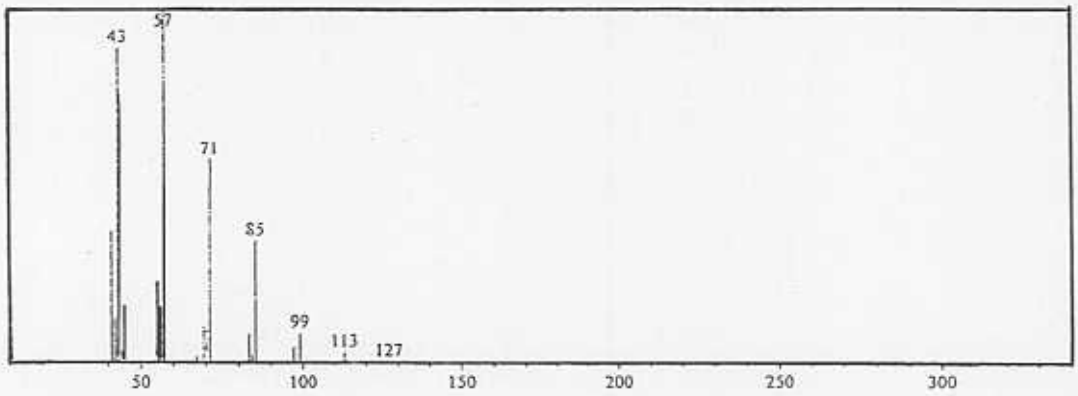
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารสกัด : Absolute (petrolum ether)

Mass peak # : 15 Ret . Time : (66.308 – 66.733) B.G. Time : (65.826 – 66.046)

Base peak : 57.20 (6227)

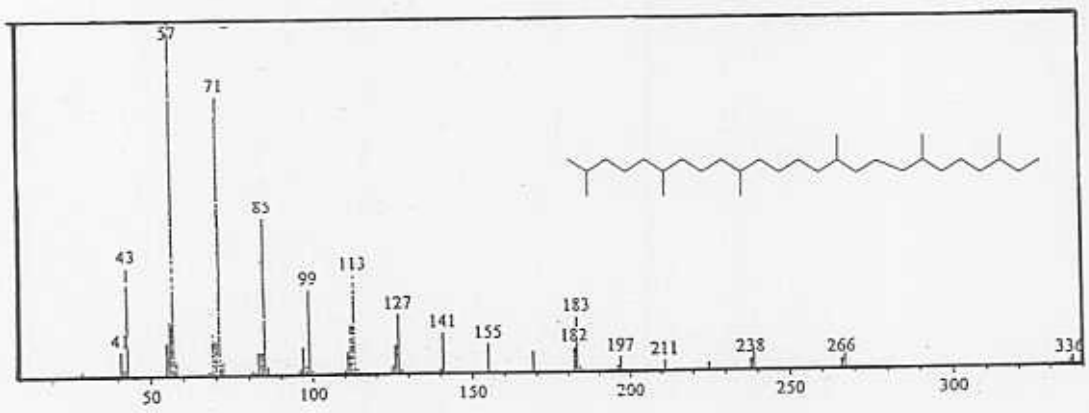


Library: NIST62.LIB

Entry : 55460 CAS : 111-01-3 Mol.Wgt : 422

Mol. Form. : $C_{30}H_{62}$

Name: Squalane, Tetracosane, 2, 6, 10, 15, 19, 23-hexamethyl -Cosbiol



Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

4.3 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของ Absolute ของสารสกัดในวิธีต่าง ๆ โดยวิธี TLC

ตารางที่ 6 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของ Absolute ของสารสกัดในวิธีต่างๆ โดยวิธี TLC

Adsorbent: 1.05735 DC-Plastikfolien Kieselgel $60F_{254}$

Solvent system: Toluene: Ethyl Acetate (90:10)

Detection: แสง UV ความยาวคลื่น 266 nm

สารทดสอบ	R_f ของ spot ที่พบ (เซนติเมตร)			
	1	2	3	4
Enfluerage	-	-	-	-
Hot Fat Extraction	0.15	0.17	-	-
Solvent Extraction	-	-	-	-
Acetone	0.11	0.15	-	-
Acetone + Petroleum Ether	0.11	-	-	-
Ethanol	0.15	-	-	-
Hexane	0.15	0.19	0.25	0.65
Petroleum Ether	0.15	0.19	0.26	0.65
Standard Eugenol	0.63	-	-	-

หมายเหตุ ดูรูปที่ 2 ประกอบ

A คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Acetone

AP คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Acetone รวมกับ Petroleum ether

EN คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Enfluerage

ET คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Ethanol

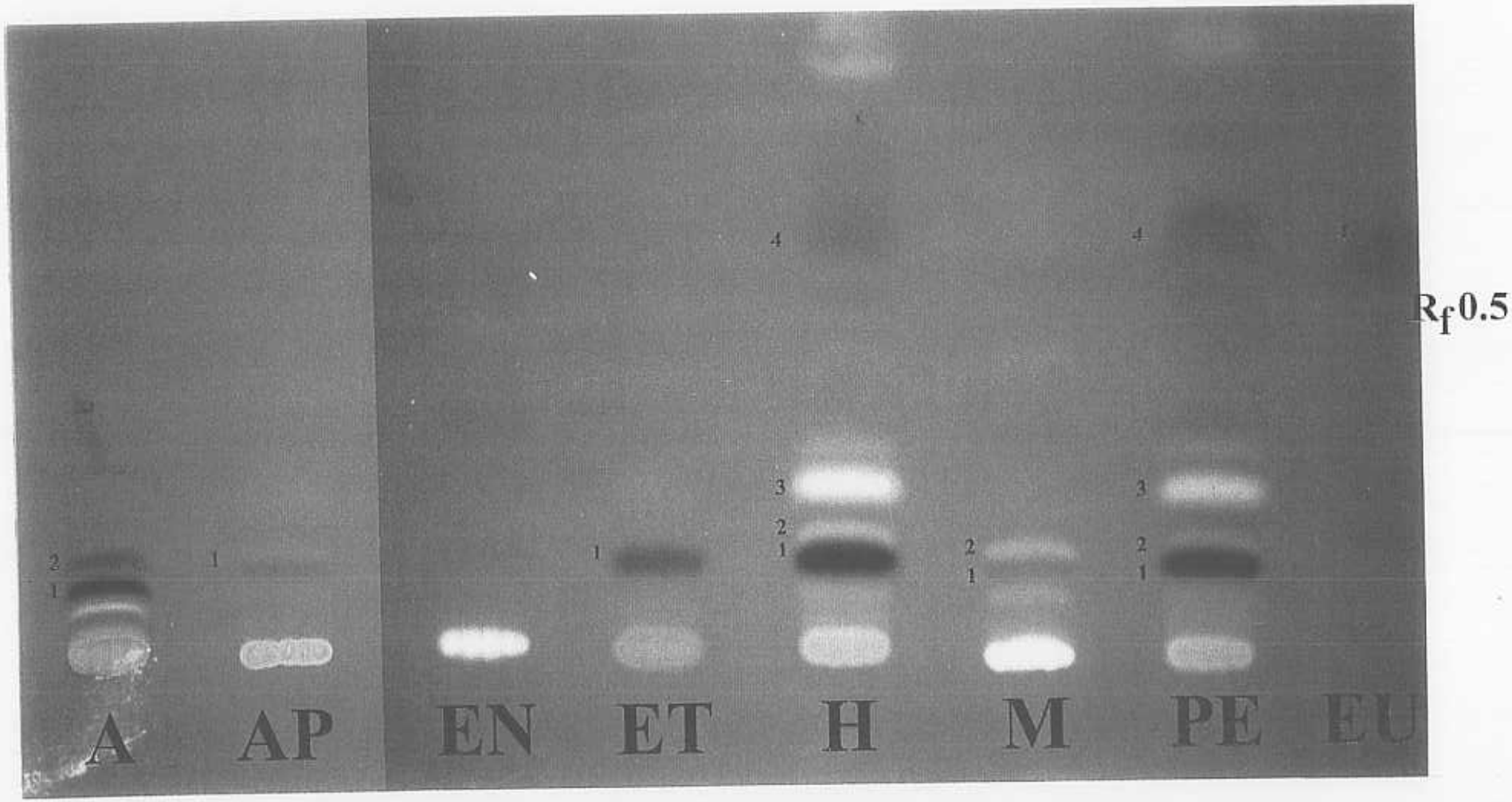
H คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Hexane

M คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Hot Fat Extraction

PE คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Petroleum ether

E คือ Standard Eugenol

Ubon Rajathanee University



รูปที่ 2 แสดงผลการตรวจสอบคุณสมบัติของ Absolute ของสารสกัดในวิธีต่าง ๆ โดยวิธี TLC ด้วยแสง UV ความยาวคลื่น 266 nm.

Ubon Rajathanee University
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Adsorbent: 1.05735 DC-Plastikfolien Kieselgel $60F_{254}$

Solvent system: Toluene: Ethyl Acetate (90:10)

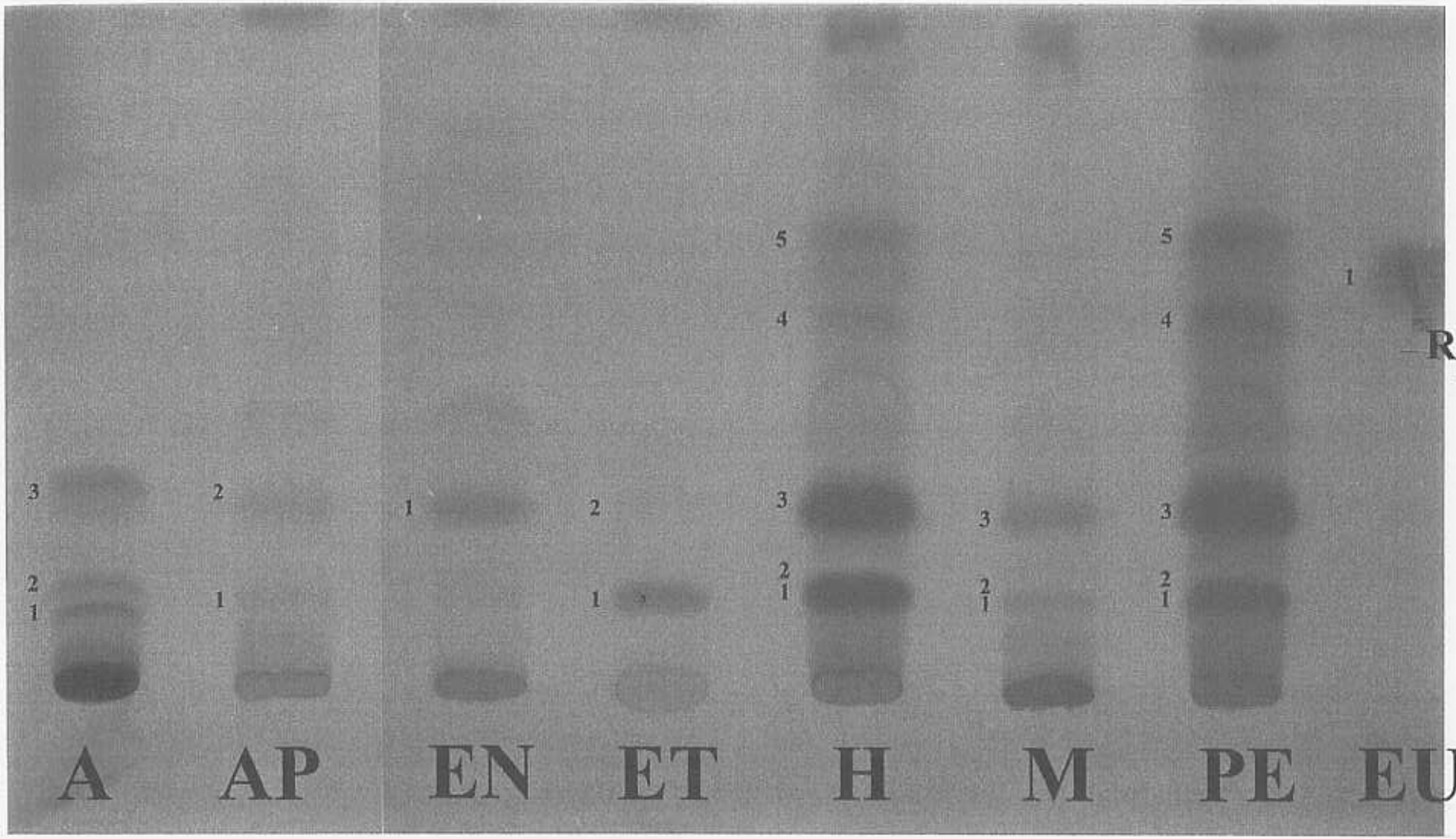
Detection: แสง UV ความยาวคลื่น 325 nm

สารทดสอบ	R_f ของ spot ที่พบ (เซนติเมตร)				
	1	2	3	4	5
Enfluerage	0.27	-	-	-	-
Hot Fat Extraction	0.14	0.17	0.27	-	-
Solvent Extraction	-	-	-	-	-
Acetone	0.11	0.15	0.27	-	-
Acetone +Petroleum Ether	0.14	0.27	-	-	-
Ethanol	0.15	0.27	-	-	-
Hexane	0.15	0.17	0.27	0.54	0.66
Petroleum Ether	0.15	0.18	0.27	0.54	0.66
Standard Eugenol	0.61	-	-	-	-

หมายเหตุ ดูรูปที่ 3 ประกอบ

A	คือ	Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Acetone
AP	คือ	Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Acetone รวมกับ Petroleum ether
EN	คือ	Absolute ที่สกัดโดยวิธี Enfluerage
ET	คือ	Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Ethanol
H	คือ	Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Hexane
M	คือ	Absolute ที่สกัดโดยวิธี Hot Fat Extraction
PE	คือ	Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Petroleum ether
E	คือ	Standard Eugenol

Ubon Rajathanee University



รูปที่ 3 แสดงผลการตรวจสอบคุณสมบัติของ Absolute ของสารสกัดในวิธีต่าง ๆ โดยวิธี TLC ด้วยแสง UV ความยาวคลื่น 325 nm.

Ubon Rajathanee University
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Adsorbent: 1.05735 DC-Plastikfolien Kieselgel $60F_{254}$

Solvent system: Toluene: Ethyl Acetate (90:10)

Detection: ด้วยการพ่น Vanillin-Sulfuric Acid Reagent

สารทดสอบ	R_f ของ spot ที่พบ (เซนติเมตร)				
	1	2	3	4	5
Enfluerage	0.30	0.46	0.53	-	-
Hot Fat Extraction	0.12	0.30	0.39	-	-
Solvent Extraction	-	-	-	-	-
Acetone	-	-	-	-	-
Acetone ผสม Petroleum Ether	0.12	0.30	0.47	-	-
Ethanol	0.11	0.22	0.30	-	-
Hexane	0.12	0.30	0.48	0.60	0.84
etroleum Ether	0.13	0.30	0.47	0.60	0.84
Standard Eugenol	0.60	-	-	-	-

หมายเหตุ ดูรูปที่ 4 ประกอบ

A คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Acetone

AP คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Acetone รวมกับ Petroleum ether

EN คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Enfluerage

ET คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Ethanol

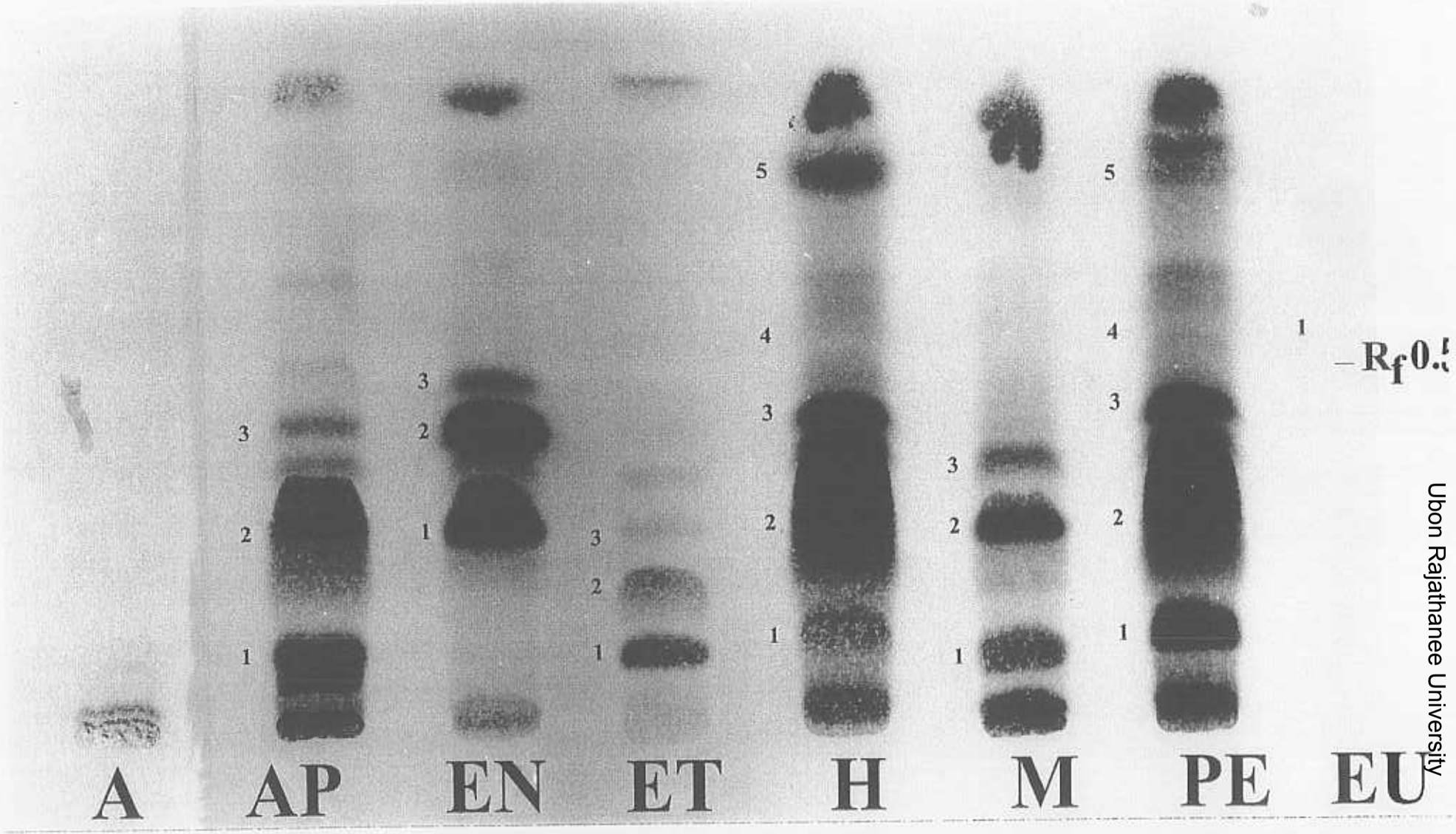
H คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Hexane

M คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Hot Fat Extraction

PE คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Petroleum ether

E คือ Standard Eugenol

Ubon Rajathanee University



รูปที่ 4 แสดงผลการตรวจสอบคุณสมบัติของ Absolute ของสารสกัดในวิธีต่าง ๆ โดยวิธี TLC ด้วยการพ่น Vanillin–Sulfuric Acid Reagent

Ubon Rajathanee University
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

4.4 ผลการการตรวจสอบคุณสมบัติของ Absolute ของสารสกัดวิธีต่างๆ ทางจุลชีววิทยา

ด้วยวิธีการทดสอบความไวของเชื้อ *S. aureus* ต่อ Absolute ของสารสกัด โดยใช้วิธี Disc agar diffusion method

ตารางที่ 7 ผลทดสอบความไวของเชื้อ *S. aureus* ต่อ Absolute ของสารสกัด โดยใช้วิธี Disc agar diffusion method

Absolute สาร*	A	AP	EN	ET	H	M	PE
Clear Zone สาร	0.626	0.986	-	0.670	0.680	-	0.752
Standard Eugenol	1.276	1.327	1.004	1.272	1.115	1.336	1.145
Control	0.588	0.656	0.520	1.130	0.570	0.786	0.590

A คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Acetone

AP คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Acetone รวมกับ Petroleum ether

EN คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Enfluerage

ET คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Ethanol

H คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Hexane

M คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Hot Fat Extraction

PE คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Petroleum ether

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในครั้งอดีตกาลมนุษย์ได้ใช้สารหอมที่ได้จากพืช และ สัตว์ ในการประกอบพิธีกรรมทางศาสนา และใช้เป็นยารักษาโรค ต่อมามีการพัฒนาการใช้สารหอมในเครื่องสำอาง นอกจากนี้สารหอมยังมีบทบาทสำคัญในแง่ของการใช้เป็นสารแต่งกลิ่นใน ยา อาหาร และ เครื่องสำอาง ซึ่งสามารถสังเกตได้จากการเติบโตของอุตสาหกรรมเครื่องหอม และมีการลงทุนตั้งสถาบันวิจัยสารหอมในหลายประเทศ เช่น ฝรั่งเศส อิตาลี และ ญี่ปุ่น เป็นต้น ในปัจจุบันการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางด้านปิโตรเคมีมีความก้าวหน้าขึ้นมาก ทำให้มีการสังเคราะห์สารหอมเลียนแบบธรรมชาติจากสารประกอบไฮโดรคาร์บอนออกมามากมาย สารสังเคราะห์เหล่านี้สามารถกระตุ้นประสาทการรับกลิ่นของมนุษย์ได้ดี แต่ก็ยังไม่เทียบเท่าสารหอมที่ได้จากธรรมชาติ อีกทั้งการสังเคราะห์สารหอมจากปิโตรเคมียังก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมาก ทำให้มีนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากพยามที่จะพัฒนาวิธีสกัดสารหอมจากธรรมชาติให้ได้มากที่สุด รวมทั้งการเสาะหาน้ำหอมกลิ่นใหม่ ศึกษาองค์ประกอบเคมีของสารหอม นอกจากนี้ยังมีความพยายามที่จะใช้สารหอมจากธรรมชาติในการบำบัดความเจ็บป่วยของมนุษย์ (Aromatherapy) ทำให้ศาสตร์ของสารหอมได้มีการพัฒนาอย่างหลากหลายมากกว่าในอดีตที่ผ่านมา อาจกล่าวได้ว่าการพัฒนาการของวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับสารหอมเป็นสิ่งหนึ่งที่สะท้อนถึงความเจริญของอารยธรรมของมนุษย์

งานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้ทดลองสกัดสารหอมจากดอกกันเกรา (*Fragraea fragran* Roxb.) โดยวิธี (1) ใช้ไขเย็นดูดซับ (Enfleurage) (2) สกัดด้วยไขร้อน (Hot fat extraction) (3) สกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) (4) สกัดด้วยไอน้ำ (Steam distillation) และได้ศึกษาองค์ประกอบเคมีของสารเคมีของสารหอม โดยวิธี Gas chromatography-Mass Spectroscopy พบว่า วิธีการสกัดโดยใช้ petroleum ether เป็นตัวทำละลาย เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารหอมจากดอกกันเกรา เนื่องจาก concrete ที่ได้จากการสกัดด้วย petroleum ether เป็นของแข็งที่มีลักษณะเหลวเล็กน้อย สีเหลือง เมื่อนำไปสกัดซ้ำด้วย absolute ethanol แล้วจะได้หัวน้ำหอมเข้มข้น (absolute) ที่เป็นของเหลวใส มีกลิ่นหอมที่ไม่แตกต่างจากดอกกันเกราสดมากนัก เนื่องจาก petroleum ether เป็นสารละลายอินทรีย์ที่มีขั้วน้อย และมีจุดเดือดต่ำ ทำให้สามารถสกัดสารหอม ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเป็นน้ำมันระเหยง่าย (volatile oil) ซึ่งสารประกอบในกลุ่ม terpenoid ซึ่งมีขั้วน้อย ดังนั้นตัวทำละลายที่จะสามารถสกัดน้ำมันหอมระเหยได้ดีจึงควรมีคุณสมบัติคล้ายกับสารหอม คือ ควรเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วน้อย เมื่อ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เปรียบเทียบการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี solvent extraction โดยใช้ hexane และ petroleum ether ซึ่งเป็นสารละลายที่มีขั้วต่ำในการสกัดสารหอมจะได้สารหอมที่มีคุณลักษณะที่ดีกว่าการใช้ acetone , absolute ethanol ซึ่งเป็นสารละลายที่มีขั้วสูงสกัด นอกจากนี้พบว่าสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายที่มีขั้วสูง จะมีกลิ่นผิดไปจากธรรมชาติ ลักษณะ concrete ที่ได้เป็นของเหลวหนืด เมื่อทิ้งไว้จะเกิดการเปลี่ยนสีเนื่องจากเกิดขบวนการ oxidation กับออกซิเจนในอากาศ อาจเกิดจากคุณสมบัติความมีขั้วทำให้สามารถละลายน้ำที่อยู่ในดอกกันเกราขณะทำการสกัด ซึ่งนอกจากจะทำให้จุดเดือดของตัวทำละลายสูงขึ้นยากต่อการกำจัดแล้ว ยังทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ทำให้สารที่สกัดได้มีกลิ่นไม่เหมือนธรรมชาติ

การสกัดด้วยไอน้ำ (Steam distillation) ไม่เหมาะสมในการสกัดเนื่องจากปริมาณน้ำมันหอมระเหยในดอกกันเกรามีน้อย จึงต้องใช้ดอกจำนวนมาก ซึ่งมีข้อจำกัดในการหาดอกกันเกราให้ได้ปริมาณที่มากพอจะสกัด ประกอบกับมีข้อจำกัดทางด้านเครื่องมือ และจากการทดลอง ปรากฏว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่สูงกว่า 40 องศาเซลเซียส จะทำให้สารสกัดจากดอกกันเกราเกิดกลิ่นเหม็นไม่สามารถนำมาใช้ได้ สำหรับผู้ที่สนใจในการสกัดด้วยวิธีนี้ อาจใช้สารที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น hexane หรือ petroleum ether แทนการใช้น้ำ และต้องทำในระบบปิดที่มีการควบคุมอุณหภูมิ

จากการทดลองสกัดสารหอมจากดอกกันเกราโดยวิธี ใช้ไขเย็นดูดซับ (enfluerage) และการสกัดด้วยไขร้อน (hot fat extraction) ซึ่งเป็นการใช้ไขมันสัตว์ในการสกัดสารหอม วิธีการนี้นิยมใช้มาตั้งแต่โบราณ และในปัจจุบันยังคงนิยมใช้ในการสกัดน้ำมันหอมจากดอกมะลิ น้ำหอมจากกุหลาบ และสารหอมจากดอกไลแลค เมื่อได้ทดลองนำวิธีการนี้มาใช้สกัดสารหอมจากดอกกันเกราพบว่า การใช้ไขเย็นจะสามารถดูดซับสารหอมจากดอกกันเกราได้ดี เมื่อเตรียมสารอยู่ในรูป absolute ถึงแม้ว่าจะได้สารที่มีกลิ่นหอมคล้ายธรรมชาติ อย่างไรก็ตาม absolute ที่ได้มีกลิ่นเหม็นหืนของไขสัตว์เจืออยู่ เมื่อทิ้งไว้นาน ๆ จะเกิดกลิ่นหืนมากขึ้น และ ไม่สามารถกำจัดไขออกได้หมดทำให้ไม่สามารถวัดปริมาณ concrete ที่แท้จริงได้ จึงไม่สามารถนำมาวัดในเชิงปริมาณและ คุณภาพได้ จากผลการทดลองครั้งนี้อาจสรุปได้ว่า หากต้องการใช้ไขร้อนและไขเย็นในการสกัดสารหอมจากดอกกันเกรา สามารถใช้ไขดูดซับชนิดใหม่ที่เป็นสารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของ petroleum ether ที่ไม่เกิดการเหม็นหืน และ สามารถกำจัดไขออกได้ง่าย หรือหากยังต้องการใช้ไขมันสัตว์เป็นตัวดูดซับสารหอมควรมีการทดลองเติม antioxidant ในปริมาณต่าง ๆ เพื่อป้องกันการเหม็นหืนของไขดูดซับ

พบว่าในการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกกันเกราจะประสบปัญหาที่คล้ายกับการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชอื่น คือ ได้ปริมาณของน้ำมันหอมระเหยในปริมาณน้อย น้ำมันหอมระเหยหรือสารหอม มีกลิ่นแตกต่างกลิ่นพืชสด มีการเปลี่ยนกลิ่นและสีเปลี่ยนไปเมื่อเก็บไว้ การใช้วิธีการสกัดแบบ steam distillation ใช้ไม่ได้ผล เนื่องจากความร้อนสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเคมี

Ubon Rajathanee University

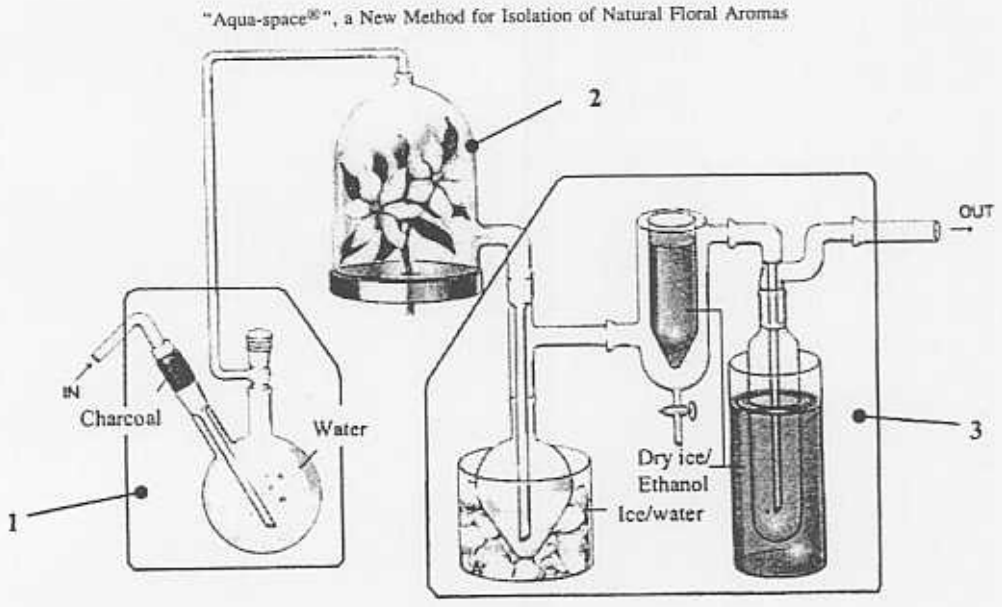
Ubon Rajathanee University

ของสารหอมทำให้กลิ่นหอมเปลี่ยนไป รวมทั้งจะทำให้น้ำมันหอมที่ระเหยได้ง่ายระเหยออกระหว่างขบวนการสกัด สาเหตุของปัญหาเหล่านี้น่าจะเกิดจากการองค์ประกอบของกลิ่นหอมหรือสารหอมของดอกกันเกราน่าจะเป็นสารประกอบ terpene hydrocarbon และ oxygenated compound สารหอมเหล่านี้มีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับน้ำหนักของพืชสดหรือพืชแห้ง สารในกลุ่ม terpene hydrocarbon สามารถสลายตัวได้ง่ายโดยความร้อนหรือแสง และการสลายตัวนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลิ่นและสีของสารหอมที่สกัดได้ ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคใหม่ในการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยใช้ gas-solid phase extraction ที่มี carbon dioxide gas ในการสกัดแทน organic solvent วิธีการนี้จะใช้ gas เป็นตัวพาน้ำมันหอมระเหย ให้เคลื่อนยที่ไปพบตัวดูดซับที่เป็นของแข็งเช่น alumina silica, silica gel และ kieselguhr เมื่อตัวดูดซับอิ่มตัวด้วยน้ำมันหอมระเหย จะทำการสกัดเอาน้ำมันหอมระเหยที่ถูกดูดซับเอาไว้ด้วย สารละลายในกลุ่ม aldehyde และ absolute ethanol โดยวิธีการนี้สามารถสกัดน้ำมันหอมระเหยจากผิวส้ม ได้ถึง 5% ของน้ำหนักเปลือก และองค์ประกอบส่วนใหญ่ของสารที่สกัดได้เป็นสารในกลุ่ม monoterpene (97.52%) และมี aliphatic aldehyde, terpene aldehyde, alcohols, oxidized hydrocarbon, ester และ sesquiterpene จำนวนเล็กน้อย (Shen Z. et. al. , 2002) นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยหรือสารหอม โดยวิธี humidified air aroma หรือมีชื่อทางการค้าว่า Aqua-space (รูปที่ 5) วิธีการนี้ได้พัฒนาจากเทคนิค head space gas chromatography ที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารหอมจากดอก camellia โดยนักวิทยาศาสตร์ที่พัฒนาวิธีการนี้ขึ้นมามีความต้องการที่จะวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารหอมของดอกไม้ที่ยังมีชีวิตอยู่ (living flower) ซึ่งในธรรมชาติดอกไม้บางชนิดจะให้กลิ่นที่แตกต่างกันในช่วงอายุดอกและในช่วงวัน รวมทั้งความเข้มข้นของกลิ่นหอมจะเปลี่ยนแปลงไปตามปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายในของพืช เช่น คอกมะลิ จะให้กลิ่นหอมที่รุนแรงในเวลาพลบค่ำ ในวันที่อบอ้าวความชื้นสูงดอกราตรีจะให้กลิ่นที่หอมเป็นพิเศษ หรือดอกไม้บางชนิดจะมีกลิ่นเปลี่ยนไปเมื่อถูกตัดออกจากต้น หลักการของ humidified air aroma คือการผ่านอากาศที่มีความชื้น ซึ่งความชื้นนั้นจะได้จาก humidify flask ที่บรรจุน้ำกลั่น (1) เข้าไปในภาชนะปิดสนิทที่บรรจุดอกไม้ที่อยู่บนต้น (living flower) (2) เมื่ออากาศชื้นจะควบแน่นและกลั่นตัวลงมาใน cool trap (3) สารเคมีโมเลกุลใหญ่จะกลั่นตัวใน cool trap ส่วนกลิ่นหอมซึ่งเป็นสารเคมีโมเลกุลเล็กจะถูก pump ดูดเข้าไปใน head space แล้ว วิเคราะห์องค์ประกอบของสารหอมด้วยวิธี GC-MS วิธี humidified air aroma ได้ถูกนำมาใช้สกัดสารหอมจาก ดอก Gardenia พบว่าสารสกัดมีกลิ่นเหมือนกับดอกไม้สด เนื่องจากดอกไม้ไม่บอบช้ำ มีการควบคุมอุณหภูมิขณะทำการสกัด และไม่จำเป็นจะต้องสกัดสารหอมจาก stationary phase ซึ่งทำให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ของสารหอมมากขึ้น (Ishsikawa M., et. Al., 2004)

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

จากที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น เพื่อลดปัญหาและข้อด้อยที่เกิดขึ้นในขบวนการสกัด ดังนั้น การพัฒนาวิธีการสกัดสารหอมจากดอกกันเกราสามารถทำได้โดยวิธี gas solid phase extraction หรือ humidified air aroma ซึ่งน่าจะแก้ปัญหาเรื่อง การเปลี่ยนของกลิ่นและสี รวมทั้งน่าจะเพิ่มปริมาณของสารหอมที่สกัดได้มากขึ้น



รูปที่ 5 อุปกรณ์ Aqua Space Isolation จาก Ishsikawa M., et. al., 2004

จากการศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดโดยเครื่องมือ Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS) โดยใช้ gas liquid chromatography column : J&W DB-5 fused silica capillary column เป็น stationary phase และ helium gas เป็น mobile phase สามารถใช้แยกสารหอมจากดอกกันเกราที่สกัดด้วย hexane และ petroleum ether และพบว่าสารหอมจากดอกกันเกราที่สกัดด้วย hexane ประกอบด้วยสารประกอบ 19 ชนิด และสารหอมจากดอกกันเกราที่สกัดด้วย petroleum ether ประกอบด้วยสารประกอบ 17 ชนิด และจะพบ Benzyl alcohol, 2-Propanol, 1-Octadecanol, 2,6,10-Dodecatrien-1-nol และ Eugenol ทั้งในสารหอมที่สกัดจาก hexane และสารหอมที่สกัดจาก petroleum ether เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า mass fragment ที่ได้กับ NIST library of volatile oil พบว่ามีสารหลายชนิดที่ไม่สามารถไม่สามารถวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีที่แน่นอนได้ เนื่องจากไม่พบ mass spectrum ที่คล้ายคลึงหรือเหมือนกับที่บันทึกไว้ใน Library ที่ใช้ในการเปรียบเทียบ จากข้อมูลทางแมส

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สเปกตรัมสามารถทำการศึกษาต่อในการศึกษาการแตกแมสสเปกตรัม เพื่อศึกษาหาสูตรโครงสร้างสารใหม่ๆ

การทดสอบทางเคมีวิธีรงเลขผิวบาง สามารถทำ TLC Finger print ใช้ Standard Eugenol (Srichand United Dispensar co.,Ltd,Germany) เป็น marker ซึ่งใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (Solvent System) ที่เหมาะสมคือ Toluene ต่อ Ethyl Acetate ในอัตราส่วน 90:10 ใช้วิธีตรวจสอบ 3 วิธีคือ การตรวจสอบโดยใช้อุลตร้าไวโอเล็ตความยาวคลื่น 266 nm.,325 nm. และใช้สารละลาย Vanillin-Sulfuric Acid Reagent พ่น ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงผลการตรวจสอบ Absolute โดย TLC ใช้ Eugenol เป็น Marker

การตรวจสอบ	ลักษณะสี	R_f value	Absolute ที่สกัดจาก	ตำแหน่ง spot ตามลำดับ
Vanillin-Sulfuric Acid Reagent	น้ำตาลส้ม	0.60	Hexane, Petroleum Ether	4, 4

นอกจากใช้ eugenol เป็น marker แล้วยัง Thin layer chromatography ยังสามารถแยกสารที่มีลักษณะเฉพาะแบบลายนิ้วมือ (TLC finger print)

ตารางที่ 9 แสดงผล TLC finger print

การตรวจสอบ	ลักษณะสี	R_f value	Absolute ที่สกัดจาก*	ตำแหน่ง spot ตามลำดับ
ความยาวคลื่น 266 nm	น้ำเงินเข้ม	0.15	A, EN, ET, H, M, PE	2,1,1,1,1
	ฟ้าอ่อน	0.19	H, PE	2, 2
ความยาวคลื่น 325 nm	น้ำเงินเข้ม	2.7	A, AP, EN, ET, H, M, PE	3,2,1,2,3,3,3
Vanillin-Sulfuric Acid Reagent	สีม่วง	0.30	AP, EN, ET, H, M, PE	2,1,3,2,2,2

* A คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Acetone

AP คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Acetone รวมกับ Petroleum ether

EN คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Enfluerage

ET คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Ethanol

H คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Hexane

M คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Hot Fat Extraction

PE คือ Absolute ที่สกัดโดยวิธี Solvent Extraction โดยใช้ Petroleum ether

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

การศึกษาฤทธิ์ทางจุลชีววิทยา พบว่า Absolute ทุกชนิดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E.coli* และเชื้อ *P.aeruginosa* และ absolute ทั้งหมดที่สกัดโดยวิธี solvent Extraction มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S.aureus* และ พบว่า absolute ที่ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมากที่สุดคือ Absolute จากสารสกัด petroleum ether รวมกับ acetone

เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต หรือ ฆ่าเชื้อ เช่น clove oil , santal oil , eucalyptol oil , thyme oil เป็นต้น จากความรู้ดังกล่าว จึงทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยใช้สารสกัดดังผลการทดลอง พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ จากผลการทดลองโดยเครื่องมือ GC-MS และ TLC พบสาร eugenol ซึ่งมีสูตรโครงสร้างเป็น phenolic ether volatile oils ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจึงทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของ eugenol และ สารสกัด ดังผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า inhibition zone ของสารสกัด Hexane และ Petroleum ether อาจจะเกิดจากฤทธิ์ของ eugenol เนื่องจากผลของ GC-MS และ TLC แสดงว่า พบสาร eugenol แต่จากผลการทดลอง TLC ไม่พบ spot ของ eugenol ในสารสกัดอื่นนอกเหนือ จาก สารสกัด hexane และ petroleum ether แต่จากผลการทดลองเกี่ยวกับ antimicrobiological test พบว่าสารสกัดเหล่านั้นยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้ แสดงให้เห็นว่า อาจมีสารอื่นอีกที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ และ จากการสกัดโดยวิธี solvent extraction โดยใช้สารสกัด acetone ร่วมกับ petroleum ether สามารถมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าสารสกัดชนิดอื่นซึ่งอาจบอกได้ว่า การที่ใช้สารสกัดร่วมดังกล่าว การใช้ acetone ร่วมสกัดกับ petroleum ether สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าการใช้ตัวทำละลายตัวอื่น จากความรู้ดังกล่าวสามารถทำการศึกษาต่อเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เพื่อพัฒนายาต้านจุลชีพต่อไป

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บรรณานุกรม

กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ.Mass Spectrometer.กรุงเทพฯ:ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,2541..

ชุบ เทศเจริญ.การศึกษาขบวนการกลั่นขั้นอุตสาหกรรมของน้ำมันหอมระเหย.กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2517.

ธนิตย์ หนูยิ้ม, บรรดิษฐ์ หงษ์ทอง, ชรินทร์ สมาธิ.ไม้กันเกรา.วารสารไม้กันเกรา 2539;1-3.

ธีระพล ประมวลกิจจา.น้ำมันหอมระเหย ตอนที่ 2 .วารสารอุสาหกรรมสาร.กรมส่งเสริมอุสาหกรรม , 2524; กุมภาพันธ์: 16-36.

นันทนา สิทธิชัย.การหาปริมาณน้ำมันหอมระเหย.สารตำรายา.กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2536; เมษายน-มิถุนายน: 34-38.

นันทนา อรุณฤกษ์.การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์.กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์,2537.

ประดิษฐ์ เชี่ยวสกุล, จงจิตต์ มีกังวาน.น้ำมันส่งกลิ่นระเหย.วารสารอุตสาหการ.ร.พ. บริษัท คณะช่าง จำกัด 2510; ตุลาคม: 28-41.

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.กันเกราต้นไม้ประจำ ม.อบ..จุลสารม.อบ.มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 2541; มกราคม: 2-3.

วันดี กฤษณพันธ์.เภสัชวินิจฉัย ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ.เล่มที่ 2.กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2536.

วันดี กฤษณพันธ์.เภสัชวินิจฉัย ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ.เล่มที่1.กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2532.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม.พจณานุกรม ไม้ดอกไม้ประดับในเมืองไทย.เล่มที่1.กรุงเทพฯ: โอ เอส พริ้นติ้ง เฮาส์, 2530.

ศิริพร ธนะแพสย์, สุวรรณี เจริญพิชิตนันท์.การศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากดอกไม้ไทย.คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2523-2524 กรุงเทพฯ:

สมเด็จพระเจ้าลูกยาเธอเจ้าฟ้าจุฬาภรณ์วลัยลักษณ์ฯ.การกลั่นน้ำมันหอมระเหย.วารสารเคมี. ยูไนเต็ด โปรดักชั่น 2512;1-5.

สุชีรา รุจิธรรมกุล, ศุภรา ปิ่นจินดา.การสกัดน้ำมันหอมระเหยและสารเคมีจากดอกไม้ชนิดต่าง ๆ . คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2536.

อัมพร คุณเอนก, จุไรรัตน์ รักวาทิน. กลูโคไซด์-ชนิดขม จากใบกันเกรา. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2519:1-11.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Alexander Fleisher. Citrus Hydrocarbon-Free Essential Oil. Perfumer & Flavorist , 1994, 19;1;11-5.

Jame M., Bobbitt, Arthur E.Schwarting and Roy J.Gritter. Introduction to chromatography. New Yolk:D.Van Nostrand Company,1968.

Hildebert Wagner and Sabine Bladt.Plant drug analysis.Berlin:Springer,1996.

Masashi Ishikawa, Tsutomu Honda, Akira Fujita, Yoshiko Kurobayashi and Takeshi Kitahara. "Aqua-space", a new head space method for isolation of natural floral aroma using humidified air as a carrier gas. Biosciences, Biotechnology and Biochemistry. 2004, 68(2), 454-457

Zhiping Shen, Vijay Mishra, Brian Imison, Martin Palmer, and Robert Fairclough., Use of adsorbent and supercritical carbon dioxide to concentrate flavor compound from orange oil. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 2002, 50, 154-1

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ภาคผนวก ก

การเตรียม Vanillin –Sulfuric Acid Reagent

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ภาคผนวก ก

การเตรียม Vanillin –Sulfuric Acid Reagent

1. เตรียม 1% Vanillin ใน Ethanol (Solution 1)
2. เตรียม 10% Sulfuric acid ใน Ethanol (Solution 2)
3. พ่น Solution 1 ตามด้วย Solution 2 หลังจากนั้นให้ความร้อนที่ 110° C ประมาณ 5-10 นาที

หมายเหตุ ใช้ในการบ่งชี้สารประกอบของน้ำมันหอมระเหย

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

ชั่ง Nutrient broth 20 กรัม เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร กวนและให้ความร้อน 150 องศาเซลเซียส จนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็น ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดย Autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

ชั่ง Nutrient agar 8 กรัม เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อน 150 องศาเซลเซียส จนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เตรียม petri disc โดยอบแห้งใน hot air oven อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ขั้นตอนต่อไปนี้ทำใน laminar air flow นำอาหารเลี้ยงเชื้อเทลงใน Petri disc ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตรประมาณ 10 มิลลิลิตร

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ภาคผนวก ข
คณะผู้ดำเนินการวิจัย

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

หัวหน้าโครงการ

นายอารี วังมณีรัตน์ : ภ.บ., MSc.(Pharmacognosy)

อาจารย์ระดับ 6 กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ผู้ร่วมวิจัย

นางสุดารัตน์ หอมหวน : ภ.บ., ภ.ม.(เภสัชเวท)

อาจารย์ระดับ 5 กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

นางสาวนิธิมา สุทธิพันธุ์ : ภ.บ., ภ.ม.(เภสัชเวท)

อาจารย์ระดับ 5 กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

Ubon Rajathanee University