



## รายงานการวิจัย

การสังเคราะห์และศึกษาคุณสมบัติของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ด้วยสารสกัด  
เหง้าอังกูรป่า เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles with  
the rhizome extract of *Ampelocissus martini* to inhibit  
pathogenic bacteria

ลักษมี วิทยา      Luksamee Vittaya  
ชาคริยา ฉลาด      Chakhriya chalad

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย  
งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2564

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการสังเคราะห์และศึกษาคุณสมบัติของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ด้วยสารสกัดเหง้าองุ่นป่าเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคนี้ ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณเงินรายได้ประจำปี 2564 โดยการนำองค์ความรู้ที่ได้จากการทำวิจัยงบรายได้ งบประมาณประจำปี 2560 ต่อยอดการเตรียมสารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์กับสารสกัดองุ่นป่าที่มีศักยภาพ เพื่อวัตถุประสงค์การออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพดีขึ้น คงสภาพและง่ายต่อการใช้งาน งานวิจัยนี้สำเร็จตามวัตถุประสงค์ และผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลจากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ และประยุกต์ใช้ในงานด้านอุตสาหกรรมอาหาร ความงาม หรือด้านการแพทย์ต่อไป

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุไรวรรณ ศิริมหาชัย สาขาวิทยาศาสตร์กายภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้การสนับสนุนงานด้านการวิเคราะห์สารและการแปลผล ตลอดจนคำปรึกษาที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย และขอบคุณสาขาศึกษาทั่วไป มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ที่ให้การสนับสนุนในการทำวิจัยนี้ ขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่ายที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้การช่วยเหลือเป็นอย่างดี ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยที่ช่วยกับการทำงานครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้ทุกประการ ตลอดจนครอบครัวและเพื่อนที่ให้ความห่วงใย เป็นกำลังใจเสมอมา ประโยชน์อันใดที่เกิดจากงานวิจัยนี้ ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของท่านและหน่วยงาน ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ลักขมี วิทยา  
ชาคริยา ฉลาด  
สิงหาคม 2565

## การสังเคราะห์และศึกษาคุณสมบัติของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ด้วยสารสกัดเหง้า องุ่นป่า เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

ลักษมี วิทยา<sup>1</sup> และ ชาศรียา ฉลาด<sup>1</sup>

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเตรียมสารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์กับสารสกัดเหง้าองุ่นป่า พิสูจน์เอกลักษณ์อนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่เตรียมได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี การหาปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบ และลักษณะพื้นผิวของสารที่เตรียมได้ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ ABTS ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion และหาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สารสามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC/MBC) ผลจากการทดลองพบว่าสามารถเตรียมสารสกัดเหง้าองุ่นป่าได้ 2 ชนิดคือสารสกัดเหง้าองุ่นป่าที่เตรียมจากตัวทำละลายน้ำและเมทานอล กับอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ 4 ชนิดจากการเตรียมจากสารตั้งต้นซิงค์ อะซีเตทกับสารสกัดเหง้าองุ่นป่าในตัวทำละลายน้ำและเมทานอล และตกตะกอนอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ได้อนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ทั้งหมด 4 ชนิดคือ ZnO NPs-01, ZnO NPs-02, ZnO NPs-03 และ ZnO NPs-04 ซึ่งสารที่เตรียมได้ให้ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด โดยเฉพาะสารอนุภาคนาโนซิงค์ ZnO NPs-04 แสดงการดักจับอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด นอกจากนี้เมื่อนำสารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ทั้ง 4 ชนิดทดสอบการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้ง *E. coli* และ *S. aureus* พบแสดงการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ โดยเฉพาะอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ ZnO NPs-04 ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคดีที่สุด โดย *E. coli* ที่ MIC เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ *S. aureus* ที่ MIC เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันสารทั้ง 4 ชนิด ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี โดยตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันของสารด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี สนับสนุนแถบการยืดของวงแหวนอะโรมาติกและหมู่ไฮดรอกซิลของสารประกอบฟีนอลิก ในช่วงเลขคลื่น 2500-1800  $\text{cm}^{-1}$  และการปรากฏแถบการดูดกลืนแสงในช่วงยูวี-วิซิเบิล บริเวณ 250-400 นาโนเมตร ของสารประกอบวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเกาะอยู่ นำสารมาวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม พบว่าสารสกัดทั้งสองชนิดมีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ สนับสนุนการเตรียมสารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์กับสารสกัดองุ่นป่าโดยวิธีสีเขียว

คำสำคัญ: การสกัด พฤษเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพ องุ่นป่า ซิงค์ อนุภาคนาโน

<sup>1</sup>อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ.สิเกา จ.ตรัง

## Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles with the rhizome extract of *Ampelocissus martini* to inhibit pathogenic bacteria

Luksamee Vittaya<sup>1</sup> and Chakhriya chalad<sup>1</sup>

### Abstract

This research aims to study the preparation of zinc oxide nanoparticle with *Ampelocissus martini* rhizome extract. Characterization was carried out by spectroscopic techniques and composition analysis. Antioxidant was determined by DPPH and ABTS method as well as antibacterial activity was examined by disc diffusion analysis with minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC). Four zinc oxide nanoparticle (ZnO NPs-01, ZnO NPs-02, ZnO NPs-03 and ZnO NPs-04) were prepared by the reaction between zinc acetate and *Ampelocissus martini* rhizome extract which obtained by water and methanol as solvents. Precipitation was done by sodium hydroxide (NaOH). The results from free radical scavenging and antibacterial activity revealed that ZnO NPs-04 was a good compound which active against *E. coli* and *S. aureus* with MIC = 10 mg/mL and 5 mg/mL, respectively. The functional groups of phenolic compounds having aromatic and hydroxyl groups in four zinc oxide nanoparticles were determined and supported by the stretching frequencies of aromatic and hydroxyl in the 1800-2500 cm<sup>-1</sup> region and the absorbance band at 250-400 nm referred to aromatic ring having hydroxyl group. The total phenolic and flavonoid contents were carried out. The results showed that phenolic and flavonoids were presented in the *Ampelocissus martini* rhizome extract and confirmed the preparation of zinc oxide nanoparticle with the extracts.

**Keywords:** extraction, phytochemical, biological activity, *Ampelocissus martini*, Zinc nanoparticle

.....  
<sup>1</sup>Faculty of Science and Fisheries Technology. Rajamangala University of Technology Srivijaya, Sikao, Trang.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ ภาษาไทย	ข
บทคัดย่อ ภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 ทฤษฎี สมมติฐานและกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	2
1.3 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
1.4 วัตถุประสงค์	10
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	11
บทที่ 2 วิธีดำเนินงานวิจัย	12
2.1 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในงานวิจัย	12
2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	12
2.3 วัสดุและสารเคมี	13
2.4 เครื่องมือ	14
บทที่ 3 ผลการทดลองและการอภิปรายผล	21
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	36
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	43
ภาคผนวก ก ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสารสกัดเหง้าอุงุ่นป่า	44
ภาคผนวก ข ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สารสกัดเหง้าอุงุ่นป่า	46

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 : ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดองุ่นป่าจากการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเมทานอล	22
ตารางที่ 3.2 : ร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระของสารสกัดองุ่นป่าและสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี DPPH และ ABTS	31
ตารางที่ 3.3 : ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระของสารอนุภาคนาโนซิงค์ที่เตรียมได้ เทียบกับสารทางการค้า ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี DPPH และ ABTS	31
ตารางที่ 3.4 : ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค <i>E. coli</i> ของสารตั้งต้นเทียบกับ ZnO NPs-01 และ ZnO NPs-02	33
ตารางที่ 3.5 : ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค <i>E. coli</i> ของสารตั้งต้นเทียบกับ ZnO NPs-03 และ ZnO NPs-04	33
ตารางที่ 3.6 : ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค <i>S. aureus</i> ของสารตั้งต้นเทียบกับ ZnO NPs-01 และ ZnO NPs-02	34
ตารางที่ 3.7 : ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค <i>S. aureus</i> ของสารตั้งต้นเทียบกับ ZnO NPs-03 และ ZnO NPs-04	34

## สารบัญตารางภาคผนวก

	หน้า
ตารางผนวก ก1 : ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเหง้าองุ่นป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเมทานอล ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร	44
ตารางผนวก ข1 : ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเหง้าองุ่นป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเมทานอล ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร	46



## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1.1 : กลไกการเกิดปฏิกิริยาอนุภาคซิงค์นาโนกับสารสกัดพืช ที่มาจาก: KrOl และคณะ 2019	4
ภาพที่ 1.2 : รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเชื้อ Escherichia coli ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่มาจาก: www.google.com	5
ภาพที่ 1.3 : รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเชื้อ Staphylococcus aureus ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ ที่มาจาก: www.google.com	7
ภาพที่ 2.1 : ขั้นตอนการสกัดส่วนเหง้าของงุ่นป่า	15
ภาพที่ 3.1 : แสดงสเปกตรัมของสารสกัดงุ่นป่าจากน้ำ (a) AM01; จากเมทานอล (b) AM02; (c) ZnO	24
ภาพที่ 3.2 : แสดงสเปกตรัมของสารอนุภาคนาโนซิงค์ (a) ZnO NPs-01; (b) ZnO NPs-02	25
ภาพที่ 3.3 : แสดงสเปกตรัมของอนุภาคนาโนซิงค์ (a) ZnO NPs-03; (b) ZnO NPs-04	26
ภาพที่ 3.4 : ภาพถ่าย FE-SEM ของสารอนุภาคนาโนซิงค์ ZnO NPs-01 (a), ZnO NPs- 02 (b), ZnO NPs-03 (c), ZnO NPs-04 (d), ZnO (e) ที่กำลังขยาย 50000, สารสกัดหยาบเหง้างุ่นป่าที่สกัดด้วยเมทานอล (AM02) (f) ที่กำลังขยาย 2000 และสารสกัดหยาบเหง้างุ่นป่าที่สกัดด้วยน้ำ (AM01) (g) ที่กำลังขยาย 10000	27
ภาพที่ 3.5 : ภาพถ่าย FE-SEM EDS mapping ของสารอนุภาคนาโนซิงค์ ZnO NPs-04	28
ภาพที่ 3.6 : ภาพถ่าย TEM ของตัวอย่างสารอนุภาคนาโนซิงค์ ZnO NPs-04 ที่กำลังขยาย x30000	29
ภาพที่ 3.7 : แสดง XRD spectra ของตัวอย่าง ZnO NPs-01, ZnO NPs-02, ZnO NPs- 03, ZnO NPs-04, ZnO และสารสกัดหยาบเหง้างุ่นป่า AM01 (AM H2O)	30



### สารบัญภาพภาคผนวก

	หน้า
ภาพผนวก ก1 : กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร	44
ภาพผนวก ข1 : กราฟมาตรฐานรูทีน แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร	46



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

มีการนำซิงค์ออกไซด์ (ZnO) มาประยุกต์ใช้งานที่หลากหลายเนื่องจากคุณสมบัติทางเคมี-ฟิสิกส์ของการมีแถบความกว้างของพลังงาน 3.33 eV และพลังงานกระตุ้น (60 meV) (Cherian และคณะ 2019) จากลักษณะเฉพาะดังกล่าว ZnO ถูกนำไปสู่ประยุกต์ใช้ทางด้านอิเล็กทรอนิกส์ เลเซอร์ในช่วงยูวีและแสงมองเห็น อนุภาคนาโนของโลหะและโลหะออกไซด์มีพื้นผิวมาก ทำหน้าที่ในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้อนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ถูกนำไปใช้งานทางการแพทย์และด้านเกษตร มีงานวิจัยการนำอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ (ZnO NPs) เป็นเยื่อเลือกผ่าน (membrane) กับเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* ในช่องปากที่ทำให้เกิดการอักเสบได้ นักวิทยาศาสตร์ได้ค้นคว้าวิธีการผลิตสารอินทรีย์ทางชีวภาพจากพืชที่หลากหลายและพบว่าสารสำคัญที่อยู่ในสารสกัดใบ ดอก ผล รากของพืชสามารถจับกับโลหะไอออนได้ผลิตภัณฑ์ระดับนาโนได้ (NPs) ดังนั้นการสังเคราะห์ทางชีวภาพกับโลหะในระดับนาโนกับสารสกัดพืชได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากมีขั้นตอนการเตรียมอย่างง่าย ประหยัดและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ซึ่งต่างจากการเตรียมทางเคมีที่ค่อนข้างมีความซับซ้อน ราคาแพงและเป็นอันตรายต่อธรรมชาติ จากการเตรียมสารนาโนทางชีวภาพนี้ทำให้ได้โครงสร้างโลหะนาโนที่หลากหลายเช่นการเตรียมอนุภาคนาโนของโลหะเงินหรือ ซิงค์ออกไซด์กับสารสกัดจากยูคาลิปตัส หรือว่านางจะเข้ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวส์หรือเป็นตัวดักจับโลหะเป็นต้น

องุ่นป่า (Wild Grapes) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Ampelocissus martinii* Planch เป็นพืชในวงศ์ VITACEAE (VITIDACEAE) พบในตำบลท่าชะ อำเภอน้ำขุ่น จังหวัดชุมพร จากการสืบค้นตามตำรายาไทยพบว่านิยมนำองุ่นป่ามาใช้ประโยชน์ เช่น ใบ เป็นยาแก้ไอ แก้ไข้ แก้หอบหืด ขับฟอกโลหิตระดู เถา ขับฟอกโลหิตระดู เป็นยาระบายอ่อนๆ และแก้ไอ ราก เป็นยาถ่ายพรรดึก (แก้ท้องผูก) แก้ไข้และแก้ไอ ยาพื้นบ้านอีสานใช้ รากฝนดื่มแก้ไข้ และเปลือกกัดลิ้น ต้มน้ำดื่มรักษาแก้อาการบวม (<https://sites.google.com/site/krupiyasr2/bak-xi-ko-y-xngun-pa>) พฤษเคมีที่พบในจากส่วนต่าง ๆ เช่นเถา เหง้า ใบ ผลขององุ่นป่ามีฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก ซาโปนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตอรอยด์ (Vittaya และคณะ 2019) และออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ของ Butylated hydroxytoluene (BHT) Butylated hydroxyanisole (BHA) หรือ Ascorbic acid พบว่าสารสกัดเหง้าจากการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ขั้วสูงยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีกว่า BHT แต่น้อยกว่า BHA และ Ascorbic (Vittaya และคณะ

2019) อีกทั้งสารสกัดองุ่นป้านี้ยังยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรครั่วทั้งแกรมบวกและแกรมลบหลากหลาย (Vittaya และคณะ 2019; Boonsod และคณะ 2014) แต่ยังไม่มีการรายงานผลการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่มีสารสกัดองุ่นป้า ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการสังเคราะห์นาโนซิงค์ออกไซด์กับสารสกัดจากพืชส่วนเหง้าขององุ่นป้าที่มีความปลอดภัยแทนการใช้สารเคมีที่เป็นพิษสูง ซึ่งโดยทั่วไปสารสกัดจากพืชธรรมชาติมีพิษเคมีหลากหลายเช่นโพลีแซกคาไรด์ เทอร์พีนอยด์ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นตัวรักษาเสถียรภาพ (stabilizing agent) เพราะมีอะตอมที่มีอิเล็กตรอน (donating atom) สามารถจับหรือเกิดพันธะกับโลหะซิงค์ได้ และตรวจสอบโครงสร้างสารโดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี วิเคราะห์สัณฐานและรายละเอียดของลักษณะพื้นผิวนาโนซิงค์ ออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร เพื่อเป็นข้อมูลสำคัญในการนำไปประยุกต์สำหรับบรรจุภัณฑ์อาหารต่อไป

## 1.2 ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

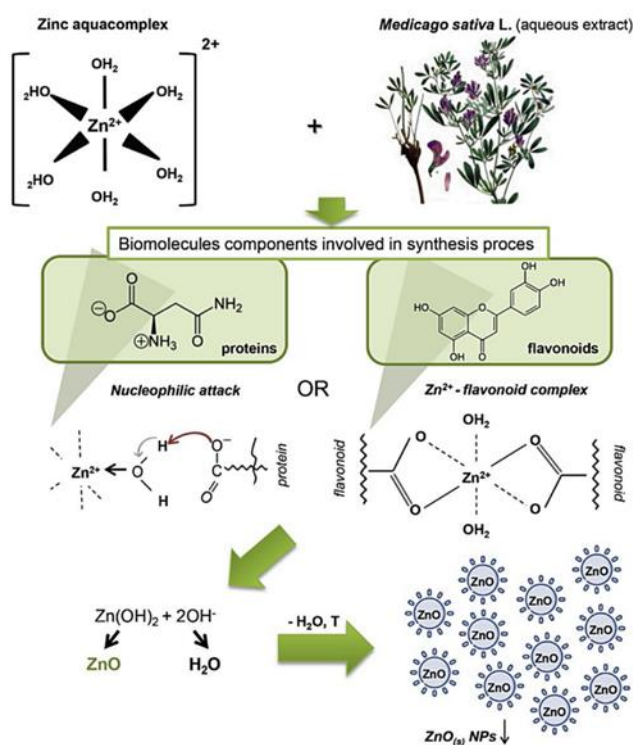
บรรจุภัณฑ์อาหาร (food packaging) มีบทบาทสำคัญในการรักษาคุณภาพที่ดีของอาหารและยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บหรือการขนส่งที่จะต้องมีการป้องกันไม่ให้อาหารลดคุณค่าทางโภชนาการหรือทำให้สมบัติทางกายภาพหรือทางเคมีเปลี่ยนแปลงเกิดการเน่าเสียโดยแบคทีเรียก่อโรค บรรจุภัณฑ์มีผลต่อผลิตภัณฑ์สุดท้ายก่อนถึงมือผู้บริโภคและหรือส่งออกในตลาดต่างประเทศ โดยในช่วงหลายปีที่ผ่านมาพลาสติกถูกนำมาใช้สำหรับเป็นบรรจุภัณฑ์ค่อนข้างมากเนื่องจากมีความเสถียรและยืดหยุ่น ประมาณ 40% ของพลาสติกที่นำมาทำบรรจุภัณฑ์ของฟิล์ม แก้ว ขวด ถาดต่าง ๆ ทำให้ปริมาณพลาสติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก เนื่องจากการย่อยสลายค่อนข้างยาก ดังนั้นผู้บริโภคจึงหันมาใส่ใจกับผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น การเตรียมบรรจุภัณฑ์ทางชีวภาพจากอนุภาคนาโนเป็นแนวทางใหม่ที่ได้รับค่านิยมจากนักวิทยาศาสตร์เนื่องจากมีวิธีการเตรียมที่ง่าย ต้นทุนน้อย และอนุภาคนาโนที่เตรียมได้ช่วยยืดอายุของอาหาร เป็นบรรจุภัณฑ์ที่ต้านเชื้อแบคทีเรีย และมีรูปแบบบรรจุภัณฑ์ที่ไวต่อการดักจับอนุมูลอิสระหรือต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอาหารได้ดี

วัสดุนาโนสำหรับใช้ทำบรรจุภัณฑ์อาหาร มักมีสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของวัสดุนาโนที่มีสารอนินทรีย์ต่าง ๆ จำเป็นต้องมีการเติมพอลิเมอร์เพื่อเพิ่มคุณสมบัติที่ดีขึ้นได้ และนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ หลากหลาย มีงานวิจัยหลายงานที่มีการเติมสารอนินทรีย์ลงในวัสดุบรรจุภัณฑ์อาหารแล้วพบว่าสามารถคงคุณค่าของรส สีและคุณค่าของอาหารหรือแม้กระทั่งระหว่างการเก็บรักษาหรือการขนส่ง ช่วยลดการเน่าเสียที่อาจเกิดขึ้นได้ (Sorrentino และคณะ 2007) วัสดุของโลหะและโลหะออกไซด์ได้รับความสนใจเพื่อนำมาทำบรรจุภัณฑ์อาหารที่ไวต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย

ซึ่งวัสดุที่ใช้ทำบรรจุภัณฑ์ที่มีอนุภาคนาโนเป็นองค์ประกอบนั้นมีมานานเช่นฟิล์มที่มีอนุภาคนาโนของซิงค์สำหรับห่ออาหารในไต้หวัน หรือส่วนผสมของอนุภาคซิงค์นาโนห่อผลแอปเปิ้ลฟูจิ คงคุณค่าของสารอาหารและลดปริมาณจุลินทรีย์เช่น *E. coli* ได้ (Li และคณะ 2010)

อนุภาคนาโนที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้มี 3 ชนิดคือนาโนซิลเวอร์ นาโนไทเทเนียมและนาโนซิงค์ ซึ่งชนิดแรกจัดเป็นสารต้านแบคทีเรียและเชื้อราที่ดี โดยการทำงานของอนุภาคนาโนที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราทำให้เซลล์ของเชื้อตายลงได้ แต่หากนำไปประยุกต์ใช้กับผ้าขาวอาจทำให้มีสีคล้ำจากเนื้อของสารนาโนซิลเวอร์ที่มีสีดำ ชนิดที่ 2 เป็นสารต้านแบคทีเรีย เชื้อราและไวรัสบางกลุ่มได้ดี แต่การทำงานของสารชนิดนี้ต้องมีแสง UV กระตุ้น และชนิดที่สามซิงค์ออกไซด์ เป็นสารต้านแบคทีเรียและเชื้อราที่ดีมาก ราคาถูกกว่านาโนซิลเวอร์ อีกทั้งซิงค์ยังเป็นสารที่มนุษย์เราต้องการ จึงเป็นมิตรต่อผู้บริโภคมากกว่าสารอื่นๆ (<https://www.Thaitextile.org/th/innovation/detail.4.1.2.html>) นอกจากนี้ยังมีนาโนกลุ่มอื่นที่นำมาประยุกต์ทางด้านความสวยงามหรือเครื่องสำอางเช่นนาโนทอง แต่ด้วยราคาสูง อาจนำไปประยุกต์ใช้ให้เหมาะกับบางประเภทเท่านั้น

ซิงค์ออกไซด์ (ZnO) เป็นสารที่ปลอดภัยและมีสมบัติเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีผลต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยแสงต่อสารอินทรีย์ การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์โดยวิธีทางชีวภาพให้ลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดีกว่าอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี (Gunalan และคณะ 2012) อนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่สังเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวภาพนั้น สามารถเตรียมได้ไม่ว่าจะเป็นพืช สาหร่าย รา ยีสต์หรือแบคทีเรีย ส่วนของพืชสามารถทำปฏิกิริยากับโลหะไอออนได้เนื่องจากมีสารสำคัญที่เรียกว่า secondary metabolite เช่นแอลคาลอยด์ ซาโปนิน สเตอรอยด์ แทนนิน ฟลาโวนอยด์ และฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์และตัวคงสภาพที่ดี ส่วนของสาหร่ายจะมีโพลีแซ็กคาไรด์ ราและแบคทีเรียมีเอนไซม์ช่วยรีดิวซ์โลหะไอออนได้ (Khandel และคณะ 2018) กลไกการเกิดปฏิกิริยาของอนุภาคซิงค์นาโนกับสารสกัดพืช นำเสนอโดย Król และคณะ (2019) ดังภาพที่ 1.1



ภาพที่ 1.1 กลไกการเกิดปฏิกิริยาอนุภาคซิงค์นาโนกับสารสกัดพืช  
ที่มา: Król และคณะ 2019

## เชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษา

เชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียมี 2 ชนิดคือ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งแต่ละชนิดเป็นแบคทีเรียก่อโรคดังนี้

### 1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae สกุล *Escherichia* สปีชีส์ *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่อยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม มีรูปร่างเป็นแท่ง ขนาด 1-2 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 1.2 ติดสีแกรมลบ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic bacteria) เคลื่อนที่โดยใช้ peritrichous flagella ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35-37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิภายในร่างกายของสัตว์เลือดอุ่น pH 7-7.5 ค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity หรือ  $A_w$ ) 0.96

*E. coli* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีแหล่งอาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์ และสัตว์เลือดอุ่น อีกทั้งยังพบได้ในสิ่งแวดล้อมเช่น น้ำ พืช อากาศ และดิน ทำให้สามารถพบเชื้อนี้ได้ในการบวนการผลิตผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำแช่เยือกแข็ง โดยอาจเกิดการปนเปื้อนของเชื้อในวัตถุดิบที่นำมา

ผลิต พนักงาน แผลง สัตว์กัฒแพะ อุปกรณ์ต่างๆ น้ำ และน้ำแข็งที่ใช้ในกระบวนการผลิต เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ถ้าควบคุมไม่ดีพอก็อาจทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดความเสี่ยงที่จะเกิดการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ได้ ส่วนใหญ่ *E. coli* ไม่ทำให้เกิดโรค แต่การตรวจหา *E. coli* ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำแช่เยือกแข็ง แสดงให้เห็นถึงโอกาสที่จะพบเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคซึ่งเจริญที่สภาวะเดียวกันกับ *E. coli* ได้ อย่างไรก็ตาม *E. coli* บางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง และบางสายพันธุ์ เช่น *E. coli* O157 : H7 อาจทำให้ผู้ที่ได้รับเชือนี้เสียชีวิตได้



ภาพที่ 1.2 รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเชื้อ *Escherichia coli* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์  
ที่มา: [www.google.com](http://www.google.com)

เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดอุจจาระร่วง จำแนกได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

1. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) สารพิษ (toxin) ที่เชื้อกลุ่มนี้สร้างขึ้นมีทั้งทนความร้อน (heat stable) และไม่ทนความร้อน (heat labile) ระยะฟักตัวของเชื้อ 10–20 ชั่วโมง สำหรับสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษมีระยะฟักตัวมากกว่า คือ 24–72 ชั่วโมง

อาการของโรคที่เกิดจาก ETEC อุจจาระร่วงเป็นน้ำโดยไม่พบมูกเลือด อาเจียน ปวดท้อง เหงื่อออกมาก และมีอาการขาดน้ำ แต่อาจไม่มีไข้ ทั้งนี้อาการต่างๆ ที่ปรากฏจะเกิดอยู่ประมาณ 3–5 วัน

2. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) โรคที่เกิดจากการบริโภคน้ำ EPEC สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ผลิตสารพิษในบริเวณลำไส้เล็กตอนบน ทำให้เกิดอาการท้องเสียคล้ายกับอหิวาตกโรค กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดอาการคล้ายโรคบิดโดยไม่มีการสร้างสารพิษ เชื้อจะเจริญในลำไส้ใหญ่และแทรกตัวไปที่ epithelial cell ของลำไส้

อาการของโรคที่เกิดจาก EPEC มีไข้ หนาวสั่น ปวดศีรษะ ปวดท้อง อุจจาระเหมือนน้ำขาวขาว อาเจียน มีอาการขาดน้ำ ช็อก โดยส่วนมากผู้ป่วยจะไม่เสียชีวิตจากพิษของเชื้อ *E. coli* แต่จะเสียชีวิตเนื่องจากการขาดน้ำ ระยะฟักตัว 8–24 ชั่วโมง

3. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) serotype ที่สำคัญคือ *E. coli* O157:H7 เป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ *E. coli* O157 : H7 ไม่หมักย่อยน้ำตาล sorbitol ภายใน 18–24 ชั่วโมง ก่อให้เกิดโรคโดยสร้างสารพิษ Shiga toxin (Stx) สามารถทำให้เกิดโรคได้แม้จะรับเชื้อเข้าสู่ร่างกายในปริมาณน้อย การติดเชื้ออาจเนื่องมาจากรับประทานเนื้อที่ปรุงไม่สุก ดื่มนมดิบ หรือนมที่ผ่านกรรมวิธีพาสเจอร์ไรส์แล้วแต่ปนเปื้อนเชื้อภายหลัง ติดเชื้อจากสัตว์เลี้ยงหรือสัตว์ในฟาร์ม และสัมผัสกับแหล่งน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อน

อาการของโรคที่เกิดจาก *E. coli* O157:H7 อุจจาระร่วงบ่อยครั้ง อุจจาระเป็นมูกเลือด ปวดท้อง นอกจากนี้ผู้ป่วยอาจมีอาการช็อค เนื่องจากสารพิษของเชื้อจะไปทำลายเม็ดเลือดแดง จึงเกิดภาวะไตวายได้ ส่วนในผู้สูงอายุเกิดภาวะเลือดออกง่าย เนื่องจากเกร็ดเลือดถูกทำลาย ทำให้เสียชีวิตได้ ผู้ติดเชื้ออาจไม่แสดงอาการของโรคแต่สามารถถ่ายทอดเชื้อให้ผู้อื่นได้

4. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) สายพันธุ์ต่างๆ ของ *E. coli* ที่แสดงคุณสมบัติรุกล้ำเข้าเซลล์ mucosal ที่พบบ่อยๆ จาก O sero group ได้แก่ O28ac, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164 และ O167 เชื้อกลุ่มนี้มีคุณสมบัติคล้าย *Shigella* มาก ต้องตรวจ O และ H antigen

อาการของโรคที่เกิดจาก EIEC ปวดบิดในท้อง ถ่ายเป็นน้ำ ปวดเบ่ง เป็นไข้ ถ่ายอุจจาระบ่อย ลักษณะเป็นมูกเลือด เนื่องจากเซลล์ถูกทำลาย มีอาการคล้ายโรคบิดที่เกิดจากเชื้อ *Shigella*

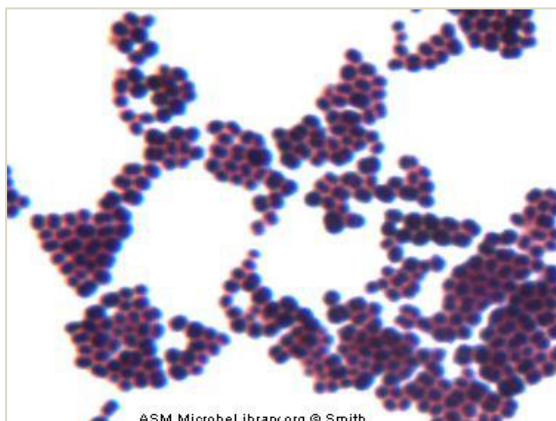
5. Enteroaggregative *E. coli* (EaggEC) เป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคอุจจาระร่วงในเด็กขวบปีแรกในบางพื้นที่ของโลก และโรคอุจจาระร่วงยืดเยื้อด้วย ระยะฟักตัว 20- 48 ชั่วโมง

## 2. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* เป็นจุลินทรีย์ใน Family Micrococcaceae ซึ่งมีคุณสมบัติย้อมติดสีแกรมบวก เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม ขนาด 0.5–1.0 ไมครอนเมตร ดังภาพที่ 1.3 เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น แต่อาจจะเป็นเชลล์เดี่ยว หรือคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ (โดยมากไม่เกิน 4 เซลล์) อยู่ปะปนด้วยกันเสมอเวลาย้อมสีแกรม

*S. aureus* ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ นูน มีสีครีมเหลือง ส้ม (ขึ้นอยู่กับชนิดของคาร์บอนอยต์ในเชลล์เมมเบรน รวมถึงอุณหภูมิ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะแวดล้อมที่ทำให้เชื้อเจริญ) *S. aureus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 6 – 46 องศาเซลเซียส โดยมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 – 37 องศาเซลเซียส ทนความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที สามารถสร้างสารพิษที่อุณหภูมิมากกว่า 10 องศาเซลเซียส ค่า pH ที่สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง

4.0–10.0 โดยมีช่วงที่เหมาะสมคือ pH 7.0–7.5 ส่วนค่า A อยู่ในช่วง 0.8–0.999 ถ้าค่า A น้อยกว่า 0.94 จะเจริญได้อย่างช้าๆ สามารถทนเกลือที่ 18 – 20%



ภาพที่ 1.3 รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์  
ที่มา: www.google.com

*S. aureus* ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobe คือ สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนมากกว่าในสภาพไม่มีออกซิเจน และสามารถสร้างสารพิษ enterotoxin แบ่งออกเป็น 8 ชนิด ได้แก่ A, B, C1, C2, C3, D, E และ H ชนิดที่พบบ่อยซึ่งเป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษ คือ A กับ D สารพิษนี้มีคุณสมบัติพิเศษ ทนความร้อน ไม่ถูกทำลายแม้ต้มเดือดครึ่งชั่วโมง และทนความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที สารพิษนี้ละลายได้ในน้ำและสารละลายเกลือ *S. aureus* จะสร้างสารพิษดังกล่าวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 10 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ทั้งสามารถทนต่อรังสีแกมมาในปริมาณที่อนุญาตให้ใช้กับอาหารอีกด้วย

แหล่งที่พบ *S. aureus* เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ที่ผิวหนัง โพรงจมูก เยื่อบุทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร และบาดแผลที่เป็นฝี หนอง รวมถึงในดิน ฝุ่นละออง

อาหารที่มักพบ *S. aureus* ปนเปื้อน ได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื้อสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์จากไข่ อาหารประเภทสลัด เช่น ไข่ ทูน่า เนื้อไก่ มันฝรั่ง และมักกะโรนี ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ครีมพาย แอแคลร์ ช็อกโกแลต แซนวิช และผลิตภัณฑ์นมที่เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม และเก็บไว้เป็นเวลานานก่อนรับประทาน

การทำให้เกิดโรค *S. aureus* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษแม้ในปริมาณน้อยกว่า 1 ไมโครกรัม ก็สามารถทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยได้ สารพิษชนิดนี้จะมีปริมาณสูงมากเมื่อมีเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร



100,000 เซลล์ต่อกรัมอาหาร ทำให้เกิดโรค acute infection (ฝี หนอง แผลติดเชื้อ septicemia) และ acute toxemia (heat stable enterotoxin)

อาการ หลังรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไปประมาณ 1 – 6 ชั่วโมง จะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วงอย่างรุนแรงจนอ่อนเพลียมาก ปวดท้องและเป็นตะคริว ส่วนมากไม่มีไข้ ในรายที่มีอาการรุนแรงอาจช็อกได้ อาจมีอาการอื่นแทรกซ้อนในผู้สูงอายุ เด็กแรกเกิด และผู้ป่วยโรคเบาหวาน แต่ส่วนใหญ่อาการจะดีขึ้นใน 8 – 24 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับสภาพความต้านทานของร่างกายและปริมาณของสารพิษที่ได้รับเข้าไปในร่างกาย

การป้องกัน โดยการรับประทานอาหารที่ปรุงสุกใหม่ๆ หากยังไม่รับประทานในทันทีให้นำอาหารที่ปรุงสำเร็จแล้วไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำอย่างรวดเร็ว เพราะที่อุณหภูมิต่ำๆ เชื้อจะหยุดการแบ่งตัวและไม่สร้างสารพิษ รวมทั้งจัดการด้านสุขลักษณะและการควบคุมกระบวนการผลิตที่ดี ป้องกันการเจริญ และการสร้างสารพิษ enterotoxin โดยการควบคุมอุณหภูมิและระยะเวลาในการประกอบอาหาร ทำลายเชื้อ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในอาหารโดยใช้ความร้อน

### 1.3 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุริสา และคณะ (2555) ศึกษาการสกัดผลองุ่นป่าด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เอทานอล เมทานอลและน้ำ จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายด้วย rotary evaporator ตรวจสอบสารฟลักซ์เคมีโดยวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และ colorimetric aluminum chloride ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในผลองุ่นป่าที่สกัดด้วยเมทานอลมีค่าสูงกว่าที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH ( $IC_{50} = 13.8 \mu\text{g/mL}$ ), ABTS ( $IC_{50} = 6.3 \mu\text{g/mL}$ ), FRAP (3.5 mM  $\text{FeSO}_4$  /g) และ CUPRAC (1065  $\mu\text{g TE/g}$ ) สรุปได้ว่าสารสกัดผลองุ่นป่าด้วยเมทานอลมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน สูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอลและน้ำโดยพบว่าปริมาณฟีนอลิกมีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r$ ) เท่ากับ 0.998 การศึกษาแสดงให้เห็นว่าผลองุ่นป่าอาจจะเป็นผลไม้ที่ประกอบด้วยสารฟลักซ์เคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี

ประสงค์ สีหนาม (2558) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟลักซ์เคมีในสารสกัดจากผลองุ่นป่า 3 ระยะเวลาคือ ผลอ่อน ผลห่ามและผลสุก ผลการทดลองพบว่าปริมาณสารฟลักซ์เคมีมีค่าแตกต่างกันตามระยะการเจริญเติบโตและชนิดของสารฟลักซ์เคมีที่ทำการตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกรวมมีปริมาณสูง สุดในสาร สกัดจากผลอ่อน รองลงมาคือผลห่ามและพบต่ำที่สุดในผลสุก ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมค่าที่ได้มีลักษณะคล้ายกับปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณแอนโทไซยานินรวมพบตรงข้าม

กับปริมาณฟีนอลิกและ ฟลาโวนอยด์ เนื่องจากพบปริมาณมากที่สุดในผลสุก รองลงมา คือ ผลห่าม และผลอ่อนมีปริมาณต่ำที่สุด ส่วนปริมาณ ซาโปนินรวมค่าที่ตรวจพบมีลักษณะคล้ายปริมาณแอนโทไซยานินรวม แสดงว่าสารพฤกษเคมีที่ประกอบในผลองุ่นป่าที่ตรวจสอบ สามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม คือ ฟีนอลิกและ ฟลาโวนอยด์พบมากในผลอ่อน ส่วนแอนโทไซยานินและซาโปนินรวม พบมากในผลสุกขององุ่นป่า เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัด พบว่าสารสกัดจากผลอ่อนมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้กว้างและมีฤทธิ์สูงที่สุดรองลงมาคือผลห่ามและผลสุก ตามลำดับ แต่สารสกัดจากองุ่นป่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *K. pneumonia* ได้ ส่วน เชื้อ *S. typhi* DMST 16122, *S. typhimurium* ATCC 14028 และ *E.coli* 0157: H7 DMST 12733 สารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อได้ทุกตัวอย่าง

Boonsod และคณะ (2014) ศึกษาสารพฤกษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดผลองุ่นป่าโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ผลที่ได้พบว่าสารสกัดเมทานอลให้ค่าปริมาณฟีนอลิกสูง โดยเฉพาะผลองุ่นป่าสีเขียวที่สกัดด้วย เมทานอลมีมากกว่าสารสกัดจากเอทานอล ขณะที่สารสกัดเอทานอลของผลองุ่นสีแดงและดำพบปริมาณฟลาโวนอยด์มากกว่าผลเขียว แต่ผลเขียวที่สกัดจากตัวทำละลายเมทานอลให้ปริมาณฟลาโวนอยด์ที่สูงด้วย ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลเขียวพบว่าสารสกัดผลเขียวจากตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอลให้ผลการต้านอนุมูลอิสระที่ดีเท่าๆกัน ตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียพบว่าผลเขียวขององุ่นป่าที่สกัดด้วยเมทานอลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ดี ขณะที่สารสกัดจากเอทานอลยับยั้งเชื้อได้หลายชนิดแต่สารสกัดจากน้ำไม่พบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย

Jirum และคณะ (2013) ศึกษาพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำผลไม้จากผลองุ่นป่า 3 สีคือผลสีเขียว สีแดงและสีดำ ผลที่ได้พบว่าเมื่อทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกและหาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu และ colorimetric aluminum ตามลำดับ สารสกัดจากผลองุ่นให้ปริมาณฟีนอลิกที่สูงโดยเฉพาะสีดำ นอกจากนี้พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษาด้วยวิธี DPPH และ FRAP กับผลสีเขียวมากที่สุด ต่างกับผลที่ได้เมื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียคือองุ่นผลแดงยับยั้งแบคทีเรียได้หลากชนิดกว่าผลเขียว

Zongo และคณะ (2010) ศึกษาปริมาณฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดอะซีโตนและน้ำจากเหง้าขององุ่นพันธ์ *Ampelocissus grantii* (Baker) Planch พบว่า สารสกัดจากอะซีโตนให้ปริมาณและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าสารสกัดจากน้ำอีกทั้งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลากชนิด

Venkatesan และคณะ (2017) ศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์กับใบพืช *Ipomoea pes-caprac* โดยวิธีสีเขียว ตรวจสอบพฤกษเคมีและยืนยันโครงสร้างและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลที่ได้พบว่าพฤกษเคมีในพืชมีส่วนช่วยรีดิวซ์เกลือโลหะได้เป็นอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์

ไซต์ ผลจากเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ยืนยันการเกิดอนุภาคนาโนที่มีความยาวคลื่น 322 นาโนเมตร และการปรากฏของแถบการยึดของหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ อนุภาคนาโนที่ได้มีขนาด 2-20 นาโนเมตร และอนุภาคนาโนซึ่งค็อกซ์ได้ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอีกทั้งมีประสิทธิภาพในการสลายสีของเมทิลลีนบูลเมื่อมีแสง ดังนั้นการประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนนี้ถือเป็นการนำวิธีการที่ง่าย ประหยัดและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมาใช้และเกิดผลดีต่อเศรษฐกิจตามมา

Jamdagni และคณะ (2018) ศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซึ่งค็อกซ์ได้ออกไซต์กับสารสกัดดอก *Nyctanthes arbor-tristis* จากสารตั้งต้นของซึ่งค็อกซ์เตท ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สันฐานวิทยาและพื้นที่ผิว อนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้มีความคงตัว 4 เดือน ขนาดของอนุภาคอยู่ที่ 12-32 นาโนเมตรโดยเทคนิค TEM นอกจากนี้อนุภาคนาโนดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดได้ดี ด้วยค่า MIC เท่ากับ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Vittaya และคณะ (2019) ศึกษาพฤษเคมีของสารสกัดเถาและเหง้าอุนป่า พบสารสำคัญหลายชนิดเช่นเทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน ฟีนอลิก และแอลคาลอยด์ ตรวจสอบปริมาณสารสำคัญสองชนิดคือปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์พบว่าสารสกัดส่วนเหง้าที่ได้จากตัวทำละลายเมทานอลมีปริมาณสูง ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงด้วย เมื่อเทียบกับ BHT แต่น้อยกว่า BHA และวิตามินซี

Vittaya และคณะ (2019) ศึกษาพฤษเคมีของสารสกัดเถาและเหง้าอุนป่าจากการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นขั้วต่างกันพบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลมีสารประกอบของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงสุด โดยเฉพาะสารสกัดจากเหง้าอุนป่า อีกทั้งออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นมีการดักจับอนุมูลอิสระกับ DPPH และ ABTS ได้ดีอีกทั้งออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทั้งแกรมบวกและแกรมลบ 7 ชนิดได้ดี สามารถต่อยอดงานวิจัยประยุกต์ใช้ทางการแพทย์หรืออุตสาหกรรมอาหาร

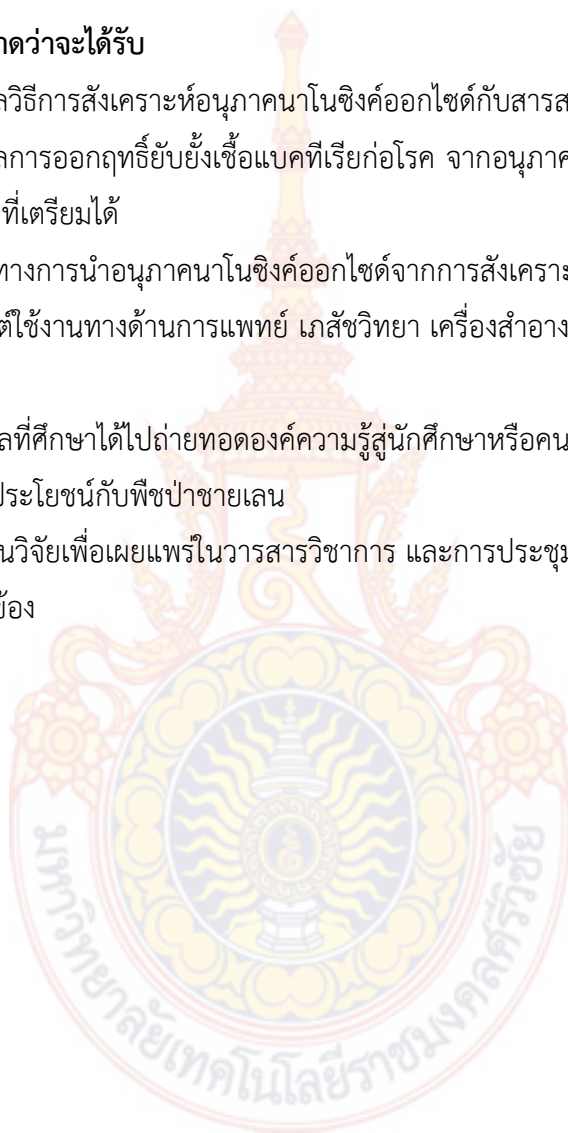
#### 1.4 วัตถุประสงค์

1. เตรียมสารสกัดเหง้าอุนป่าโดยวิธีสีเขียวและศึกษาปริมาณฟีนอลิกกับฟลาโวนอยด์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณโดยวิธีทางเคมี
2. สังเคราะห์อนุภาคนาโนซึ่งค็อกซ์ได้ออกไซต์กับสารสกัดเหง้าอุนป่าที่เตรียมได้ในข้อ 1 โดยวิธีสีเขียว
3. พิสูจน์เอกลักษณ์อนุภาคนาโนซึ่งค็อกซ์ได้ออกไซต์ที่เตรียมได้ด้วยเทคนิค UV-Vis, FT-IR, SEM, TEM และ XRD
4. ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันหรือการดักจับอนุมูลอิสระของวัสดุอนุภาคนาโนซึ่งค็อกซ์ได้ออกไซต์ด้วยวิธี DPPH กับ ABTS

5. ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของวัสดุนาโนซิงค์ออกไซด์ที่ผลิตได้ในข้อ 4 โดยวิธี disc diffusion method
6. ตรวจสอบประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้จากการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC/MBC)

### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์กับสารสกัดจากพืช โดยวิธีสีเขียว
2. ได้ข้อมูลการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค จากอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์กับสารสกัดพืชที่เตรียมได้
3. ได้แนวทางการนำอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์จากการสังเคราะห์โดยวิธีการสีเขียว ไปประยุกต์ใช้งานทางด้านการแพทย์ เกษษวิทยา เครื่องสำอาง อาหารหรืออุตสาหกรรม ประมง
4. นำข้อมูลที่ศึกษาได้ไปถ่ายทอดองค์ความรู้สู่ผู้รู้หรือนักศึกษาหรือคนในชุมชนชายฝั่งทะเล ต่อยอดการใช้ประโยชน์กับพืชป่าชายเลน
5. ได้ผลงานวิจัยเพื่อเผยแพร่ในวารสารวิชาการ และการประชุมสัมมนาทางวิชาการในสาขาที่เกี่ยวข้อง



## บทที่ 2

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 2.1 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในงานวิจัย

เก็บเหง้าขององุ่นป่าจากพื้นที่ตำบลท่าแซะ อำเภอท่าแซะ จังหวัดชุมพร และส่งตรวจสอบพันธุ์พืช ณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (S. Aimyang 1) นำส่วนของพืชมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบที่อุณหภูมิ 45-50 °C จนแห้ง และเตรียมสกัดต่อไป แล้วเก็บในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท

#### 2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. กรวยกรอง
2. ขวดก้นกลม (round bottom flask)
3. กระจกนาฬิกา (watch glasses)
4. ขวดแก้วขนาดเล็ก (vial)
5. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
6. แท่งแก้วคน (stirring rod)
7. ปีกเกอร์ (beaker)
8. หลอดทดลอง (test tube)
9. หลอดหยด (dropper)
10. อุปกรณ์หั่น เช่น มีด กรรไกร
11. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
12. ปากคีบ (forcep)
13. สำลีพันไม้ (cotton swab)
14. เครื่องดูดสารละลายอัตโนมัติ (autopipette)
15. ขวดโหลแก้ว
16. กรวยแก้ว
17. กระดาษอลูมิเนียมฟอยด์
18. กระบอกตวง

## 2.3 วัสดุและสารเคมี

### 2.3.1 สารเคมี

#### สารเคมีจาก Difco

- Nutrient Agar
- Tryptic Soy Agar
- Tryptic Soy Broth
- Antibiotic Disc 6 mm จาก MN Germany

#### สารเคมีจาก Loba Chemie laboratory reagents & Fine Chemicals

- Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent

#### สารเคมีจาก Sigma-Aldrich

- Gallic acid
- Rutin

#### สารเคมีจาก Ajex Finechem Pty Ltd

- Sodium carbonate anhydrous,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- Aluminium Chloride ( $\text{AlCl}_3$ )

### 2.3.2 ตัวทำละลาย

#### ตัวทำละลายจาก Lab. Scan analytical science

- Acetone,  $\text{CH}_3\text{OCH}_3$ , A.R.grade
- Chloroform,  $\text{CHCl}_3$ , A.R. grade
- Dichloromethane,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , A.R. grade
- Ethanol,  $\text{EtOH}$ , A.R.grade
- Hexane,  $\text{C}_6\text{H}_{14}$ , A.R. grade
- Methanol,  $\text{MeOH}$ , A.R.grade
- Ethyl acetate,  $\text{EtOAc}$ , A.R. grade

#### ตัวทำละลายจาก Merck

- Dimethyl sulphoxide, DMSO, A.R. grade
- Absolute Ethanol, A.R. grade

## 2.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดลอง

2.4.1 *Escherichia coli* (*E. coli*) TISTR527

2.4.2 *Staphylococcus aureus* TISTR746

จากศูนย์จุลินทรีย์ ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ (ศคช.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

## 2.5 เครื่องมือ

2.5.1 เครื่องระเหยตัวทำละลาย (rotary evaporator)

2.5.2 ตู้อบชนิดควบคุมอุณหภูมิ

2.5.3 UV-1800 Spectrophotometer

2.5.4 เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)

2.5.5 ตู้อบความร้อน (hot air oven)

2.5.6 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)

2.5.7 เตาให้ความร้อน (stirrer hot plate)

2.5.8 เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่ง

2.5.9 ตู้ดูดความชื้น

## 2.6 วิธีดำเนินการวิจัย

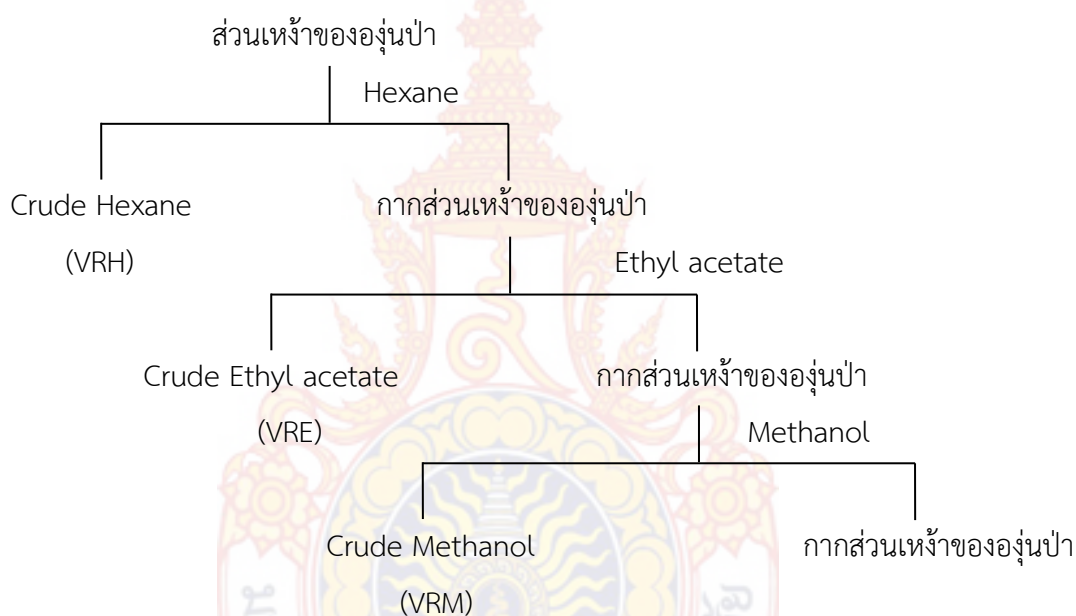
2.6.1 การเตรียมสารสกัดงุ่นป่า โดยวิธีสีเขียว (รหัส AM01)

การเตรียมสารสกัดงุ่นป่าโดยวิธีสีเขียว ตามวิธีการ ของ Venkatesan และคณะ (2017) โดยปรับเปลี่ยนเล็กน้อย ดังนี้ นำเหง้าแห้งงุ่นป่ามา 5 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำส่วนผสมไปต้มเป็นเวลา 20 นาทีจนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีของสารสกัดเหง้างุ่น ปั่นที่ผลการทดลอง จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (อาจทำได้ 2 ครั้งหากสารละลายขุ่น) จากนั้นนำสารละลายไปหมุนเวียงเป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัดเศษพืชส่วนที่ไม่ต้องการออกไป นำสารสกัดเก็บที่อุณหภูมิห้องเพื่อเตรียมการทดลองต่อไป

2.6.2 การเตรียมสารสกัดงุ่นป่า โดยตัวทำละลายอินทรีย์ (รหัส AM02)

การเตรียมสารสกัดงุ่นป่า โดยตัวทำละลายอินทรีย์ ตามวิธีการของ Vittaya (2020) และ

เลือกเฉพาะส่วนสกัดที่ได้จากเมทานอล มาทำการทดลองต่อเนื่องจากปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งจัดเป็นสารสำคัญ พบในปริมาณสูงสุดเมื่อเทียบกับอีกสองตัวทำละลาย (Vittata และคณะ 2020) นำส่วนเหง้าองุ่นป่าที่แห้งและบดหยาบไปแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน (hexane) ปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมากรอง นำเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายไประเหยที่เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารสกัดหยาบที่ได้แห้งจะได้สารสกัดหยาบ (crude) ในชั้นเฮกเซน ทำวิธีการเดียวกันกับตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเมทานอล โดยใช้กากของพืชที่ผ่านการกรองแล้ว ผึ่งให้แห้งมาแช่ด้วยตัวทำละลายดังกล่าวตามลำดับซ้ำ จนได้สารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล นำสารสกัดหยาบที่ได้ในแต่ละส่วนใส่ในขวด vial เพื่อนำไปศึกษาหาปริมาณสารและทดสอบการออกฤทธิ์ต่อไป ซึ่งวิธีการสกัดส่วนเหง้าแสดงดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 ขั้นตอนการสกัดส่วนเหง้าขององุ่นป่า

2.6.3 ศึกษาปริมาณฟีนอลิกกับฟลาโวนอยด์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณโดยวิธีทางเคมี โดยนำสารละลายที่ได้ในข้อ 2.6.1 และ 2.6.2 มาตรวจสอบพิกษเคมีเบื้องต้น และหาปริมาณตามวิธีการของ Vittaya และคณะ (2019) โดยปรับเล็กน้อย ดังนี้

#### ทดสอบปริมาณฟีนอลิก

แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือการตรวจสอบเชิงคุณภาพและการตรวจสอบเชิงปริมาณ ดังนี้

การตรวจสอบเชิงคุณภาพ: วิธีทดสอบเฟอร์ริก คลอไรด์ ( $\text{FeCl}_2$  test)

นำสารสกัดมา 2 มิลลิลิตร หยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ( $\text{FeCl}_3$ ) 1% 2-3 หยด ลงไปในสารสกัด หากปรากฏสารละลายสีเขียวดำแสดงว่าพบฟีนอลิก



การตรวจสอบเชิงปริมาณ: วิธี folin-Ciocalteu

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดหยาบ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Vittaya และคณะ (2019) ดังนี้ โดยให้สารประกอบฟีนอลิกทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์โฟลีน และใช้กลลิกเป็นสารมาตรฐาน โดยนำสารสกัดที่เตรียมได้จากข้อ 2.6.1 และข้อ 2.6.2 เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นปีเปตมา 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย Folin- Ciocalteu Reagent 0.2 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 1 นาที เติมน้ำกลั่น  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 7 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 60 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดกลลิกเพื่อคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก (มิลลิกรัมกรดกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ)

#### ทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์

แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือการตรวจสอบเชิงคุณภาพและการตรวจสอบเชิงปริมาณ ดังนี้

การตรวจสอบเชิงคุณภาพ: วิธีทดสอบโลหะรีดิวส์ ด้วยกรด

นำสารสกัดมา 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 2-3 ชิ้น นำไปต้ม และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) ให้สารละลายสีเหลือง ส้ม หรือแดง แสดงว่าพบ ฟลาโวนอยด์

การตรวจสอบเชิงปริมาณ: วิธี Aluminium Chloride colorimetry

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบโดยดัดแปลงจากวิธีของ Senguttuvan และคณะ (2014) ดังนี้ นำสารสกัดที่เตรียมได้จากข้อ 2.6.1 และข้อ 2.6.2 เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมา 0.2 มิลลิลิตร ตามด้วย  $\text{NaNO}_2$  5% ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งบ่มไว้ 6 นาที จากนั้นเติม  $\text{AlCl}_3$  ร้อยละ 10 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม  $\text{NaOH}$  1 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร ครบ 1.5 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง สีชมพูที่ปรากฏมีฟลาโวนอยด์ ปริมาณของฟลาโวนอยด์คำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของรูทีน (มิลลิกรัมรูทีนต่อกรัมสารสกัดหยาบ)

#### 2.6.4 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์กับสารสกัดเหง้าอุงุ่นป่าโดยวิธีสีเขียว

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์กับสารสกัดเหง้าอุงุ่นป่าโดยวิธีสีเขียว (รหัส AM01) และสารสกัดอุงุ่นป่า โดยตัวทำละลายอินทรีย์ (รหัส AM02) โดยเตรียมตามวิธีการของ Venkatesan และคณะ (2017) และ Jamdagni และคณะ (2018) โดยปรับการทดลองบางส่วนดังนี้

2.6.4.1 เตรียมสารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์กับสารสกัดเหง้าอุงุ่นป่าโดยวิธีสีเขียว (รหัส AM01)

วิธีที่ 1: เติมน้ำสารสกัดอุงุ่นป่า (AM01) 25 มิลลิลิตร (จากข้อ 2.6.1) ลงในปิกเกอร์ ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 นาที จากนั้นค่อยๆ เติมน้ำกลั่น

Zn(OAc)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.195 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ที่ละลาย เติมหให้หมดภายใน 40-50 นาที ได้สารแขวนลอยสีน้ำตาลแดง จากนั้นค่อยๆ เติม 2 โมลาร์ NaOH 3 มิลลิลิตร ที่ละลายจนหมด ตั้งปฏิกิริยาต่อจนครบ 2 ชั่วโมง สังเกตเห็นตะกอนสีน้ำตาลแดงปรากฏเพิ่มมากขึ้น และนอนกัน กรองสารแบบสุญญากาศ ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 ล้างของแข็งด้วยน้ำกลั่น และตามด้วยเอทานอล นำของแข็งที่ได้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ปิดตู้อบ นำของแข็งออกและวางในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักที่ได้ (รหัส ZnO NPs-01)

วิธีที่ 2: ชั่ง Zn(OAc)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.195 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ละลายจนหมด จากนั้นค่อยๆ เติม 2 โมลาร์ NaOH 3 มิลลิลิตร ที่ละลายจนหมด จะได้ของแข็งสีขาว จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 70-80 องศาเซลเซียส ค่อยๆ เติมสารสกัดอุนป่า (AM01) 25 มิลลิลิตร ได้ของแข็งสีแดงอิฐ ตั้งปฏิกิริยาต่อจนครบ 2 ชั่วโมง สังเกตเห็นตะกอนสีน้ำตาลแดงปรากฏเพิ่มมากขึ้น และนอนกัน กรองสารแบบสุญญากาศ ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 ล้างของแข็งด้วยน้ำกลั่น และตามด้วยเอทานอล นำของแข็งที่ได้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ปิดตู้อบนำของแข็งออกและวางในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักที่ได้ (รหัส ZnO NPs-02)

2.6.4.2 เตรียมสารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์กับสารสกัดเหง้าอุนป่าโดยตัวทำละลายอินทรีย์ (รหัส AM02)

วิธีที่ 1: ชั่งสารสกัดอุนป่า (AM02) (จากข้อ 2.6.2) 0.2 กรัม ที่ได้จากตัวทำละลายเมทานอล (AM MeOH) เติมน้ำกลั่นลงไป 25 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส จนของแข็งละลาย กรองแบบธรรมดาเพื่อกำจัดสิ่งที่เหลืออยู่ จากนั้นนำสารที่กรองได้มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย Zn(OAc)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.195 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ที่ละลาย เติมหให้หมดภายใน 40-50 นาที ได้สารแขวนลอยสีน้ำตาลแดง จากนั้นค่อยๆ เติม 2 โมลาร์ NaOH 3 มิลลิลิตร ที่ละลายจนหมด ตั้งปฏิกิริยาต่อจนครบ 2 ชั่วโมง สังเกตเห็นตะกอนสีน้ำตาลแดงปรากฏเพิ่มมากขึ้น และนอนกัน กรองสารแบบสุญญากาศ ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 ล้างของแข็งด้วยน้ำกลั่น และตามด้วยเอทานอล นำของแข็งที่ได้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ปิดตู้อบนำของแข็งออกและวางในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักที่ได้ (รหัส ZnO NPs-03)

วิธีที่ 2: ชั่ง Zn(OAc)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.195 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 2 โมลาร์ NaOH 3 มิลลิลิตร ที่ละลาย ได้ตะกอนสีขาวแขวนลอย จากนั้นปรับอุณหภูมิให้ได้ 70-80 องศาเซลเซียส แล้วค่อยๆ เติมสารสกัดอุนป่า (AM02) ที่เตรียมไว้ (ชั่ง 0.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร กรองส่วนที่เหลือออก) ที่ละลายให้หมดภายใน 20-30 นาที ได้ของแข็งสีน้ำตาลปนขาว จากนั้นเติม 2 M NaOH เพื่อให้ตะกอนตกตะกอนสมบูรณ์ ตั้งต่อจนครบ 2 ชั่วโมง สังเกตเห็นตะกอนสีน้ำตาลแดงปรากฏเพิ่มมากขึ้น และนอนกัน กรองสารแบบสุญญากาศ ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42

ล้างของแข็งด้วยน้ำกลั่น และตามด้วยเอทานอล นำของแข็งที่ได้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ปิดตู้อบ นำของแข็งออกและวางในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักที่ได้ (รหัส ZnO NPs-04)

2.6.5 พิสูจน์เอกลักษณ์อนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ด้วยเทคนิค UV-Vis, IR, SEM, TEM และ XRD

1) วิเคราะห์การดูดกลืนแสง (UV-visible absorption spectroscopy)

นำสารสกัดของปูนป่าและอนุภาคซิงค์นาโนออกไซด์ วัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 200-800 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และยืนยันลักษณะพีคที่ปรากฏเมื่อมีสารประกอบฟีนอลิก (Das และคณะ 2017)

2) วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน (infrared spectroscopy)

นำสารสกัดของปูนป่าและอนุภาคนาโนซิงค์นาโนออกไซด์ วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารประกอบ ซึ่งมีสมบัติแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นสารประกอบฟีนอลิก โดยนำสารสกัดมาบดรวมกับโพแทสเซียม โบรไมด์ (KBr) และนำไปวัดแถบการดูดกลืนในช่วง  $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  ย่านความถี่เฉพาะของหมู่ฟังก์ชันจะปรากฏที่ตำแหน่งต่าง ๆ (Poojary และคณะ 2015; Bhuvanewari และคณะ 2015)

3) วิเคราะห์สัณฐานและรายละเอียดของลักษณะพื้นผิวของตัวอย่าง โดยวิธี Scanning Electron Microscope (SEM), transmission electron microscope (TEM) และ วิเคราะห์และระบุชนิดของสารประกอบทั้งในเชิงคุณภาพ (qualitative) และเชิงปริมาณ (quantitative) โดยวิธี X-Ray Diffractometer (XRD) โดยส่งวิเคราะห์ ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

2.6.6 ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันหรือการดักจับอนุมูลอิสระของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ ด้วยวิธี DPPH กับ ABTS

วิธี DPPH

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Seethalaxmi และคณะ (2012) โดยใช้ BHT (Butylated hydroxytoluene) และกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลายที่จะวัดค่าการดูดกลืนแสง ได้แก่ สารละลาย control; สารละลายมาตรฐาน DPPH และ BHT (1:1); สารละลายมาตรฐาน DPPH และสารละลายนาโนซิงค์ออกไซด์ เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำสารละลายที่เตรียมไว้ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงคำนวณ %Radical Scavenging (เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ)

$$\text{DPPH scavenging activity \%Radical Scavenging} = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100$$

เมื่อ  $A_A$  = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

$A_B$  = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

#### วิธี ABTS

วิธี ABTS free radical – scavenging activity เป็นการทดสอบโดย ABTS (2,2'-Azino – bis – (3 – ethylbenzothiazoline – 6 – sulfonic acid diammonium salt) จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุบวกด้วยการเติมโปแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นไม่มีสี โดยใช้วิธีทดสอบตามวิธีของ Rahim และคณะ (2008) คือดูดสารสกัดมา 1 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายผสมระหว่าง ABTS 75 mM และโปแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (potassium persulfate) 1.225 mM ที่ผสมทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเจือจาง 10 เท่าด้วยเอทานอล เติมน้ำไป 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยมีกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็น positive control คำนวณค่าตามสูตร

$$\text{ABTS scavenging activity (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}/A_{\text{control}})] \times 100$$

(โดยที่  $A_{\text{control}}$  และ  $A_{\text{sample}}$  เท่ากับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS และสารสกัด)

#### 2.6.7 ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่ผลิตได้ในข้อ

##### 2.1.4 โดยวิธี disc diffusion (NCCLS, 1993)

ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี Disc diffusion ดังนี้ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) TISTR527 กับ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) TISTR746 จากศูนย์จุลินทรีย์ ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ (ศคช.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยเลือก isolated colony จำนวน 3-5 โคโลนี โดยใช้ loop แตะใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) หลอดละ 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-6 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบเชื้อให้มีความขุ่นมาตรฐาน McFarland No.0.5 โดยใช้เครื่อง spectrophotometer วัดค่า Absorbance ที่ 625 นาโนเมตร จะได้ค่า OD ระหว่าง 0.08-0.10 ถ้าเชื้อขุ่นมากกว่าความขุ่นมาตรฐานให้เจือจางด้วยอาหาร TSB เชื้อที่มีความขุ่นเท่ากับความขุ่นมาตรฐานนี้จะมีจำนวนเชื้อ ประมาณ  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml ใช้ sterile cotton swab จุ่มลงในเชื้อที่อยู่ในอาหาร TSB นำมา swab เป็น 3 ระบาย (three dimension swab) ให้เชื้อกระจายทั่วผิวน้ำอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) ปล่อยให้ผิวอาหาร TSA แห้ง (3-5 นาที) ใช้ forceps ที่ปราศจากเชื้อคีบแผ่น Disk ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร วางบนผิวของอาหาร TSA กดเบาๆ ให้แผ่น Disk ติดกับวุ้น ฉีดสิ่งสกปรกหรืออนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ ลงไปตำแหน่งละ 10 ไมโครลิตร โดยใช้เครื่องดูดสารละลายอัตโนมัติที่ปราศจากเชื้อ และใช้ตัวทำละลายๆ นั้นเป็นตัวควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บันทึกผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสของการยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) เป็นมิลลิเมตร

2.6.8 ทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentration, MIC)

ทดสอบหาค่า MIC โดยวิธี micro dilution method (ดัดแปลงจาก CLSI, 2009) เตรียมเชื้อแบคทีเรียตามวิธีการ ข้อ 2.6.7 และเตรียมสารสกัดกับอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์แต่ละชนิดให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ใส่ใน 96 well plate หลุมที่ 2-12 หลุมละ 100 ไมโครลิตร และนำสารสกัด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมที่ 1 และ 2 ทำการเจือจางสารสกัดจากหลุมที่ 2 ลงครั้งละ 2 เท่า ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่ใส่ไว้ก่อนหน้านี้ จนถึงหลุมที่ 11 จะได้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดอยู่ระหว่าง 0.098-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมเชื้อที่ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ  $1 \times 10^8$  CFU/ml ลงในหลุมที่ 1 - 12 แต่ละหลุมปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำ 96 well plate บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม 10 ไมโครลิตร ของ 0.18% resazurin indicator ลงไปในแต่ละหลุม บ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ อ่านผลการทดสอบเมื่อครบเวลาที่กำหนด

โดยการอ่านผลการทดสอบค่า MIC อาศัยการเปลี่ยนสีของ resazurin ตามวิธีของ Drummond and Waigh (2000) คือ ถ้าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (ผลบวก) resazurin จะมีสีน้ำเงินหรือสีม่วงเหมือนเดิม แต่ถ้าสารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (ผลลบ) เชื้อจะสามารถเจริญเติบโตและเปลี่ยนสี resazurin ให้เป็นสีชมพู โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (โดยเลือกค่า MIC ที่เหมือนกันอย่างน้อย 2 ซ้ำ) ใช้ยาปฏิชีวนะ gentamicin เป็น positive control การเตรียมยา gentamicin เตรียมที่ความเข้มข้น 32 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เจือจางลงครั้งละ 2 เท่า และเติมเชื้อลงไป ความเข้มข้นสุดท้ายของยาจะมีค่าความเข้มข้นระหว่าง 0.125-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.6.9 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

ทดสอบหาค่า MBC โดยใช้วิธี drop plate (ดัดแปลงจาก CLSI, 2009) หยดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจากการทดสอบหาค่า MIC ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA โดยใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการทดสอบหาค่า MBC โดยบันทึกค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ คือ ไม่มีโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เพื่อยืนยันผลการทดลอง

2.5.10 รวบรวมข้อมูลการทดลองและสรุปงานวิจัย

2.5.11 เขียนรายงานวิจัย

### บทที่ 3

#### ผลการทดลองและการอภิปรายผล

##### 3.1 เตรียมสารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์

###### 3.1.1 การเตรียมสารสกัดองุ่นป่าโดยวิธีสีเขียว เพื่อใช้เป็นตัวรีดิวซ์โลหะซิงค์

การเตรียมสารสกัดองุ่นป่าโดยวิธีสีเขียว ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายสกัดสารสำคัญด้วยวิธีการต้ม (decoction) เป็นเวลา 15-20 นาที เมื่อกรองสารแยกกาก เก็บสารสกัดในรูปของเหลวไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งต่อไปจะใช้รหัสสารสกัดองุ่นป่าด้วยน้ำเป็น AM01 ศึกษาการเตรียมเป็นสารอนุภาคนาโนซิงค์ต่อไป และสามารถนำสารสกัดบางส่วนระเหยตัวทำละลายออกเพื่อส่งวิเคราะห์เทคนิคทางสเปกโทรสโกปีเช่น อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Infrared Spectroscopy) การดูดกลืนแสงของสาร (UV-Visible absorption spectroscopy) และตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ เชิงคุณภาพ และปริมาณต่อไป

นอกจากนี้ นำสารสกัดองุ่นป่าที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลแบบแช่ (maceration) ซึ่งต่อไปจะใช้รหัสสารสกัดองุ่นป่าด้วยเมทานอลเป็น AM02 จากงานวิจัยยังบร่ายได้ปี 60 (ลักขมี และคณะ 2560) มาศึกษาการเตรียมสารอนุภาคนาโนซิงค์และเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ ซึ่งพบว่าจากการศึกษาการเตรียมสารอนุภาคนาโนซิงค์จากสารตั้งต้นซิงค์ อะซีเตท  $[Zn(CH_3COO)_2] \cdot 2H_2O$  กับสารสกัดองุ่นป่า AM01 โดยมีโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวตกตะกอน ผ่านการเตรียมโดยมีลำดับการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ก่อนและหลังการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้นทั้งสอง ทำให้ได้สารอนุภาคนาโนทั้งหมด 2 ชนิด ซึ่งให้รหัสเป็น ZnO NPs-01 กับ ZnO NPs-02 อีกทั้งศึกษาการเตรียมสารอนุภาคนาโนซิงค์จากสารตั้งต้นซิงค์ อะซีเตท  $[Zn(CH_3COO)_2] \cdot 2H_2O$  กับสารสกัดองุ่นป่า AM02 โดยมีโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวตกตะกอน ผ่านการเตรียมโดยมีลำดับการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ก่อนและหลังการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้นทั้งสอง ทำให้ได้สารอนุภาคนาโนทั้งหมด 2 ชนิด ซึ่งให้รหัสเป็น ZnO NPs-03 กับ ZnO NPs-04 และสารอนุภาคนาโนซิงค์ทั้ง 4 ชนิดนำไปศึกษาพื้นผิวและองค์ประกอบของธาตุด้วยเทคนิคต่าง ๆ ที่จะกล่าวเป็นลำดับถัดไป

##### 3.2 ศึกษาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดองุ่นป่าโดยวิธีสีเขียวทั้งเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ

องค์ประกอบสำคัญของพืชคือสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิล (Rice Evans และคณะ 1996) ทำหน้าที่ในการดักจับอนุมูลอิสระ หากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากจะส่งผล

โดยตรงต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Srisuwan และคณะ 2014; Abed และคณะ 2013) และสารกลุ่มนี้ยังทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์โลหะเกิดเป็นสารประกอบต่าง ๆ มากมาย ดังนั้นการตรวจสอบสารกลุ่มนี้เบื้องต้นเชิงคุณภาพ จะนำไปสู่การตรวจสอบเชิงปริมาณต่อไป

### 3.2.1 การตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ เชิงคุณภาพ

1) เมื่อนำสารสกัดอ่อนป่าจากการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเมทานอล มาตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิกเบื้องต้น โดยวิธีทางเคมี โดยการทำให้เกิดสีด้วยสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ( $\text{FeCl}_3$ ) 1% พบว่าสารสกัดอ่อนป่ามีสารประกอบฟีนอลิก เนื่องจากเปลี่ยนสีสารละลายเป็นสีเขียวอมดำ

2) เมื่อนำสารสกัดอ่อนป่าจากการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเมทานอล มาตรวจสอบฟลาโวนอยด์เบื้องต้น โดยวิธีทางเคมี โดยการทำให้เกิดสีด้วยโลหะแมกนีเซียม (Mg) และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl conc.) พบว่าสารสกัดอ่อนป่ามีฟลาโวนอยด์ เนื่องจากเปลี่ยนสีสารละลายเป็นสีเหลือง

### 3.2.2 ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ของสารสกัดอ่อนป่าจากการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและ เมทานอลเชิงปริมาณ

เมื่อนำสารสกัดมาทำปฏิกิริยากับสารละลายเฟอร์ริน (Folin-Ciocalteu) จะสามารถหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก โดยเทียบกับสารมาตรฐานแกลลิกได้ ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 3.1 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดอ่อนป่าจากการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเมทานอล คำนวณจากสมการ  $y = 0.0018x + 0.0138$  ( $r^2 = 0.9993$ ) เทียบกับมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ (mg GAE/g extract) และนำสารสกัดมาทำปฏิกิริยากับสารละลายอะลูมิเนียม คลอไรด์ จะสามารถหาปริมาณของฟลาโวนอยด์ โดยเทียบกับสารมาตรฐานรูทีนได้ ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 3.1 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดอ่อนป่าจากการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเมทานอล คำนวณจากสมการ  $y = 0.0007x - 0.0205$  ( $r^2 = 0.9962$ ) เทียบกับมิลลิกรัมสมมูลรูทีนต่อกรัมสารสกัดหยาบ (mg RU/g extract)

### ตารางที่ 3.1 ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดอ่อนป่าจากการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเมทานอล

สารสกัด อ่อนป่า	ปริมาณฟีนอลิกรวม (mg GAE/g extract)	ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (mg Ru/g extract)
AM01	3.12 ± 0.06	3.31 ± 0.18
AM02	5.24 ± 0.17	11.07 ± 0.53

หมายเหตุ: ทำการทดลอง 3 ซ้ำ; ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน; AM01 = สารสกัดอ่อนป่าด้วยตัวทำละลายน้ำ; AM02 = สารสกัดอ่อนป่าด้วยตัวทำละลายเมทานอล

จากการตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ สารสกัดมีองค์ประกอบของวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นองค์ประกอบ ทำหน้าที่ในการรีดิวซ์โลหะซิงค์ได้ ซึ่งอาจมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาของอนุภาคซิงค์นาโนกับสารสกัดพืช ซึ่งนำเสนอโดย KrÖl และคณะ (2019)

### 3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดและอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่เตรียมได้ด้วยเทคนิค UV-Vis, FT-IR, SEM, TEM และ XRD

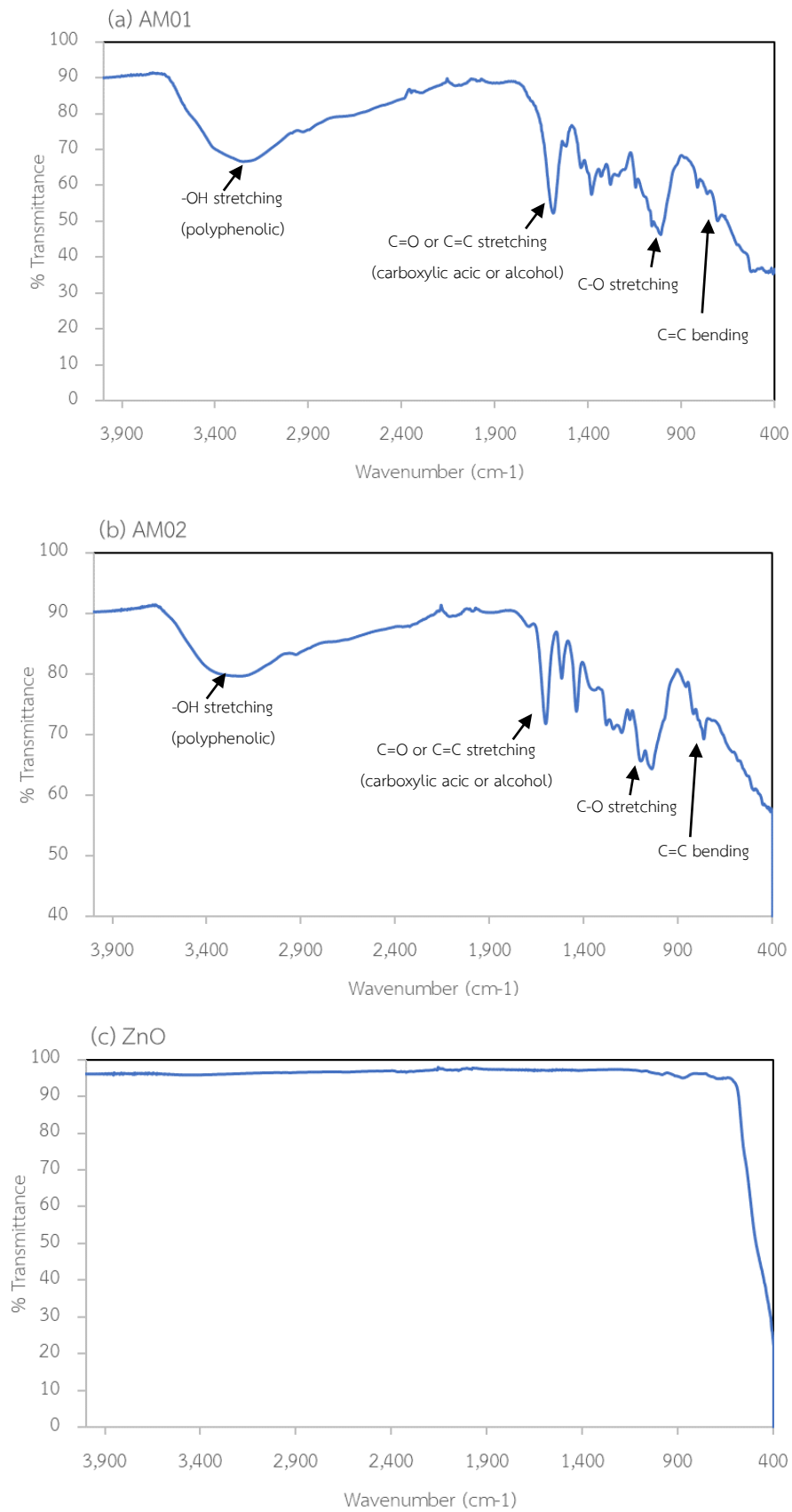
#### 3.3.1 การวัดการดูดกลืนแสง

สารสกัดอุนป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเมทานอล แสดงแถบการดูดกลืนช่วง 250-300 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงที่แสดงการทรานซิชันของอิเล็กตรอน และสนับสนุนการมีโครงสร้างวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิล นอกจากนี้สารสกัดอุนป่า AM01 และ AM02 ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นซิงค์ อะซีเทต สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ยืนยันการเข้าทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้นทั้งสองได้ และตกตะกอนอนุภาคนาโนซิงค์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ได้สารอนุภาคนาโนซิงค์ทั้งหมด 4 ชนิดคือ ZnO NPs-01, ZnO NPs-02, ZnO NPs-03 และ ZnO NPs-04

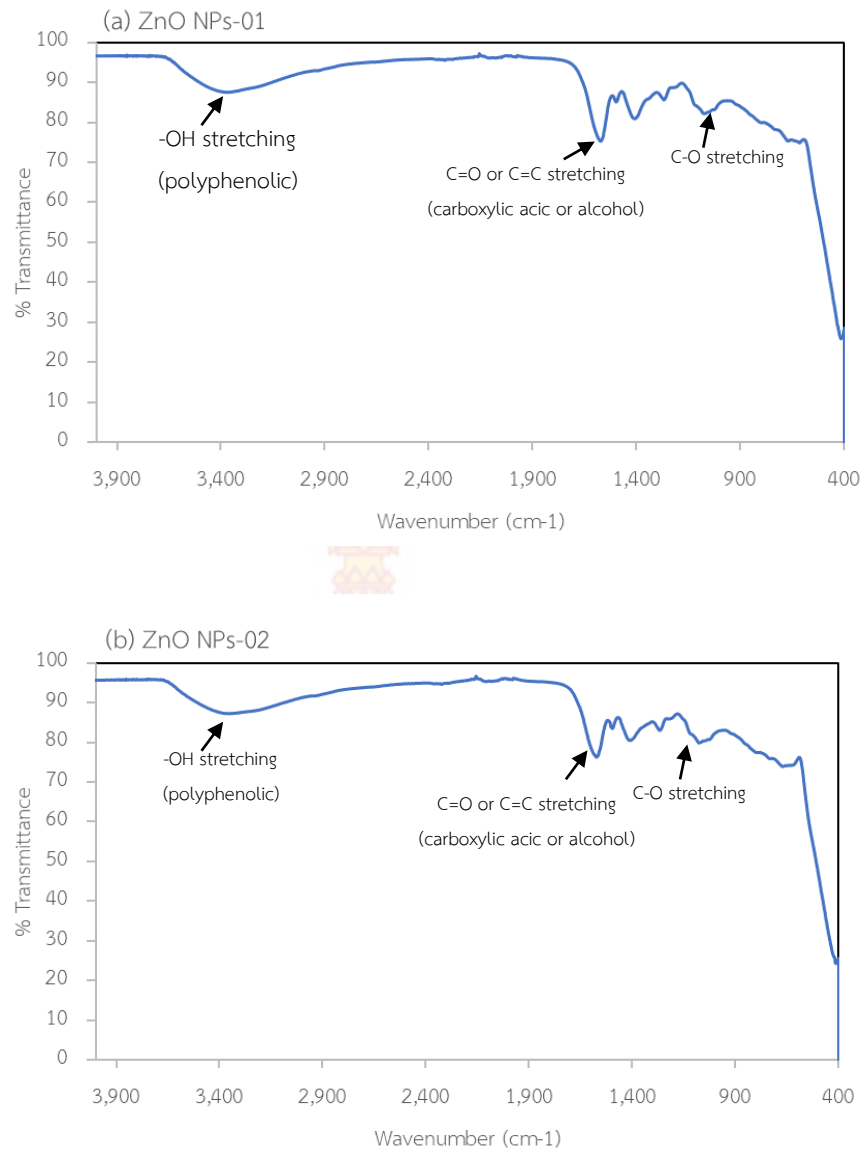
#### 3.3.2 การตรวจสอบหมู่ฟังก์ชัน

สเปกตรัมของสารสกัดอุนป่าและสารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ แสดงแถบหมู่ฟังก์ชันในช่วง 500-4000  $\text{cm}^{-1}$  แสดงดังรูปที่ 3.1-3.3 ซึ่งเป็นแถบการดูดกลืนของวงแหวนฟีนอลซึ่งเป็นองค์ประกอบในสารสกัด เช่นแถบการยืดที่เลขคลื่น 3500  $\text{cm}^{-1}$  เป็นแถบการยืดของ O-H และเลื่อนไปทางที่มีความยาวคลื่นมากขึ้นสนับสนุนการเกิดเป็นสารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ และแถบการดูดกลืนที่เลขคลื่น 2930  $\text{cm}^{-1}$  แสดงแถบการยืดของ O-H และ C-H ของหมู่ฟังก์ชันกรดคาร์บอกซิลิก แอลกอฮอล์ หรือแอลเคน และแถบการยืดที่มีความเข้มสูงในช่วงเลขคลื่น 1600  $\text{cm}^{-1}$  อาจเป็นแถบการยืดของ C=O หรือ C=C ของอนุพันธ์ของกรดหรือแอลกอฮอล์ ซึ่งเลื่อนไปในกรณีที่เกิดเป็นสารอนุภาคนาโนซิงค์ และการปรากฏแถบการดูดกลืนที่เลขคลื่น 1100  $\text{cm}^{-1}$  เป็นแถบการยืดของ C-O ของเอสเทอร์ หรืออาจเป็นแถบการยืดของอะลิฟาติกเอสเทอร์ หรือพันธะของวงแหวนกลูโคสในสารสกัด และแถบการดูดกลืนที่เลขคลื่น 500-600  $\text{cm}^{-1}$  เป็นแถบการงอของ C=C และแถบการดูดกลืนที่เลขคลื่น 585  $\text{cm}^{-1}$  สนับสนุนการเกิดพันธะของโลหะซิงค์กับออกซิเจน ZnO-NPs ซึ่งสอดคล้องกับ Prasad และคณะ (2017)

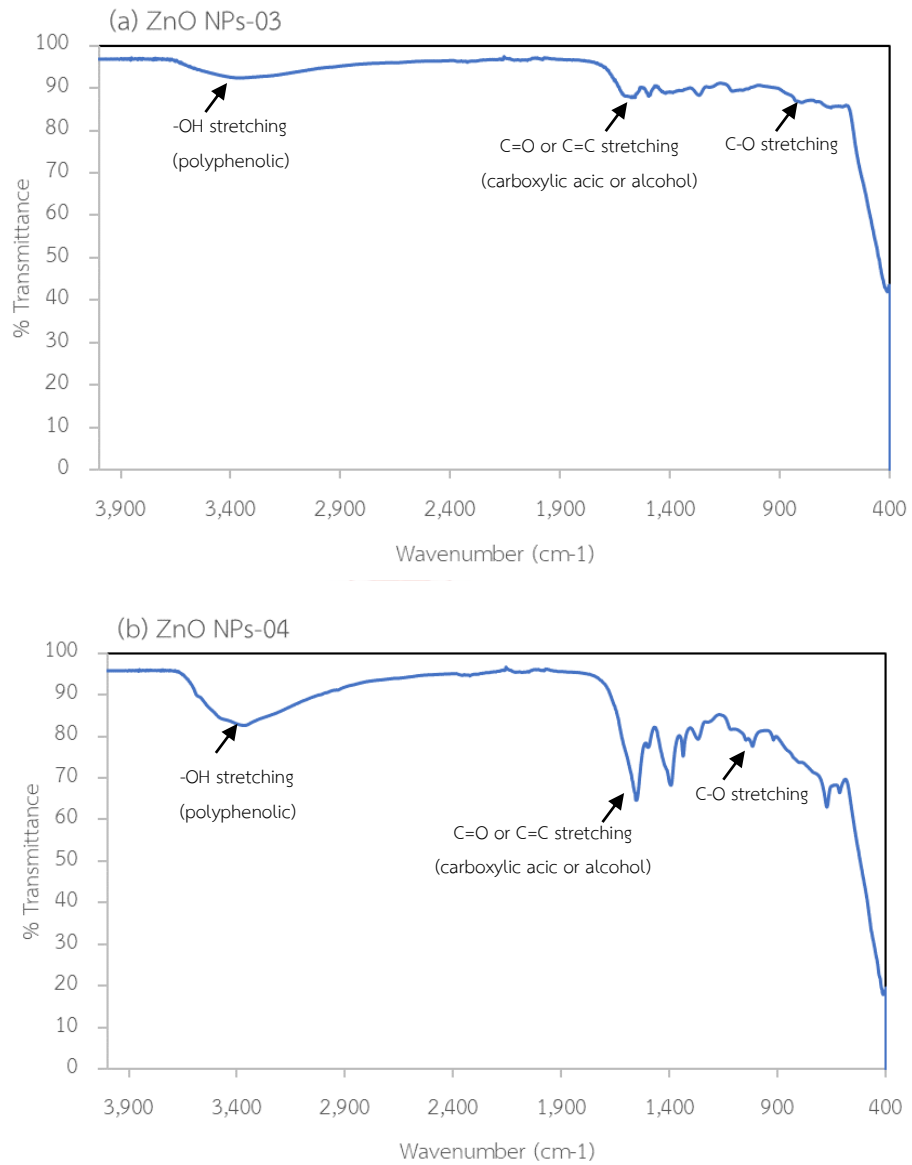




รูปที่ 3.1 แสดงสเปกตรัมของสารสกัดงุ่นป่าจากน้ำ (a) AM01; จากเมทานอล (b) AM02; (c) ZnO



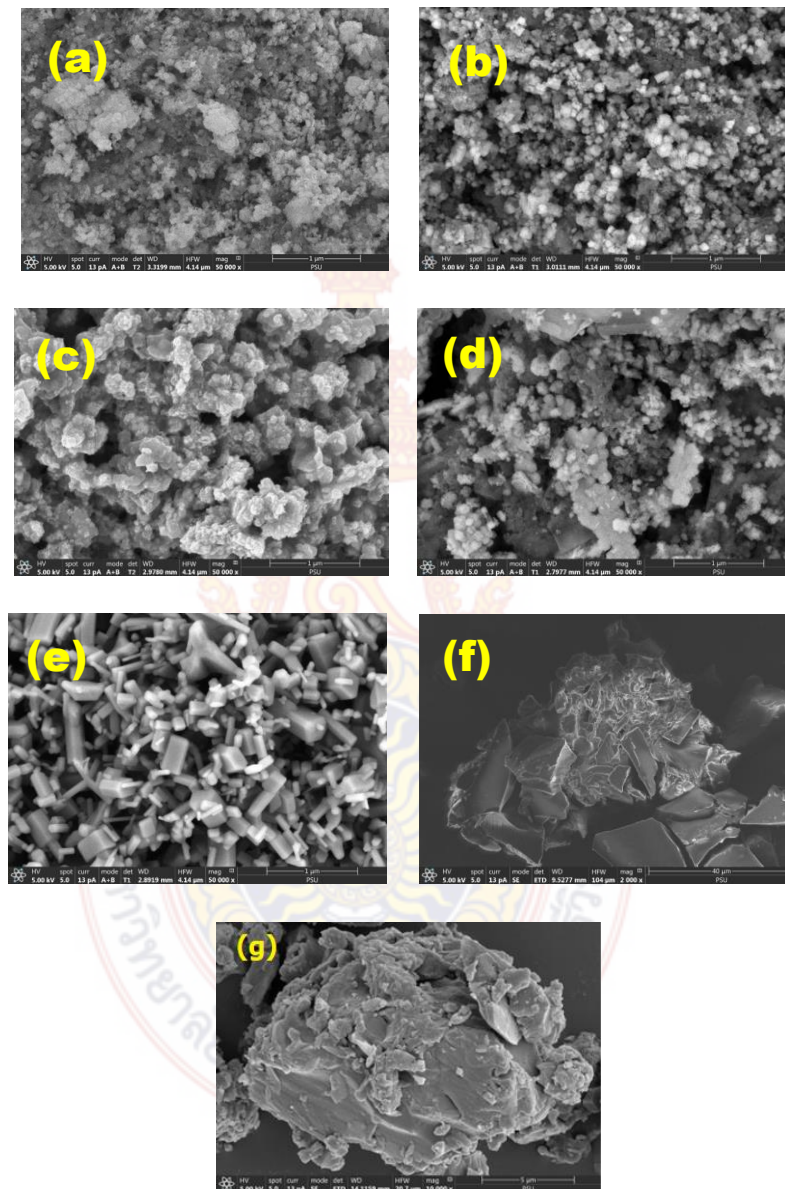
รูปที่ 3.2 แสดงสเปกตรัมของสารอนุภาคนาโนซิงค์ (a) ZnO NPs-01; (b) ZnO NPs-02



รูปที่ 3.3 แสดงสเปกตรัมของอนุภาคนาโนซิงค์ (a) ZnO NPs-03; (b) ZnO NPs-04

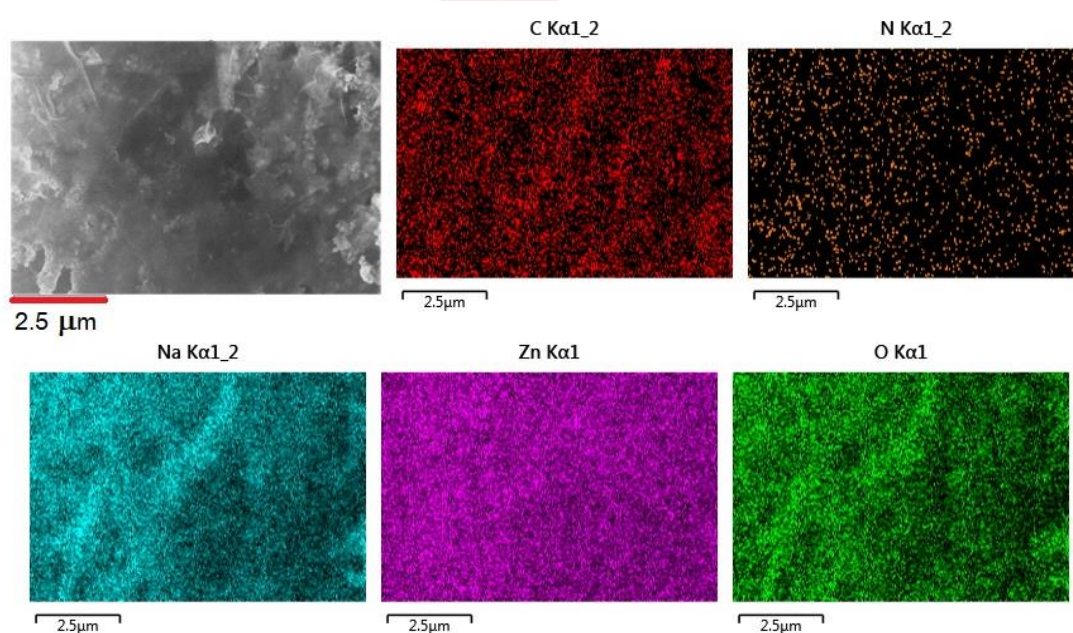
### 3.3.3 การตรวจสอบพื้นผิว กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope : SEM)

การทดลองโดยวิธีการตรวจสอบพื้นผิว กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ร่วมกับการถ่ายภาพ (FE-SEM with EDS-mapping) แสดงผลการทดลองดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 ภาพถ่าย FE-SEM ของสารอนุภาคนาโนซิงค์ ZnO NPs-01 (a), ZnO NPs-02 (b), ZnO NPs-03 (c), ZnO NPs-04 (d), ZnO (e) ที่กำลังขยาย 50000, สารสกัดหยาบเหง้าอุนป่าที่สกัดด้วยเมทานอล (AM02) (f) ที่กำลังขยาย 2000 และสารสกัดหยาบเหง้าอุนป่าที่สกัดด้วยน้ำ (AM01) (g) ที่กำลังขยาย 10000

รูปที่ 3.4 (a) – (g) แสดงรูปสัณฐานของตัวอย่าง ZnO NPs-01 ZnO NP-02 ZnO NPs-03 ZnO NPs-04 ZnO (กำลังขยาย x50000) สารสกัดหยาบเหง้าอุนป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล (AM02) (กำลังขยาย x2000) และสารสกัดหยาบเหง้าอุนป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ (AM01) (กำลังขยาย x10000) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบสัณฐานของสารสกัดเหง้าอุนป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ กับ ZnO ที่สังเคราะห์ได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิดฟิลด์อิมิชชัน พบว่าสารสกัดในรูปที่ 3.4 (f) – (g) มีลักษณะเป็นก้อนพื้นผิวค่อนข้างเรียบขนาดใหญ่ ไม่มีรูปแบบผลึก ซึ่งต่างจากรูปที่ 3.4 (a) – (d) ที่แสดงลักษณะสัณฐานเป็นอนุภาคขนาดเล็กเกาะกันเป็นกลุ่ม โดยเฉพาะรูปที่ 2 (d) จะสังเกตเห็นผลึกของ ZnO ที่รวมกันกับกลุ่มอนุภาคขนาดเล็กอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับรูปที่ 3.4 (e) ซึ่งเป็นรูปของ ZnO แสดงให้เห็นถึงลักษณะของผลึกที่มีรูปร่างเป็นแท่งสามมิติขนาดต่าง ๆ กัน ซึ่งผลของรูปถ่ายอิเล็กตรอนแบบส่องกราดนี้ สอดคล้องกับผลการทดลองจาก XRD ที่ยืนยันการมีโครงสร้างของ ZnO ในตัวอย่าง

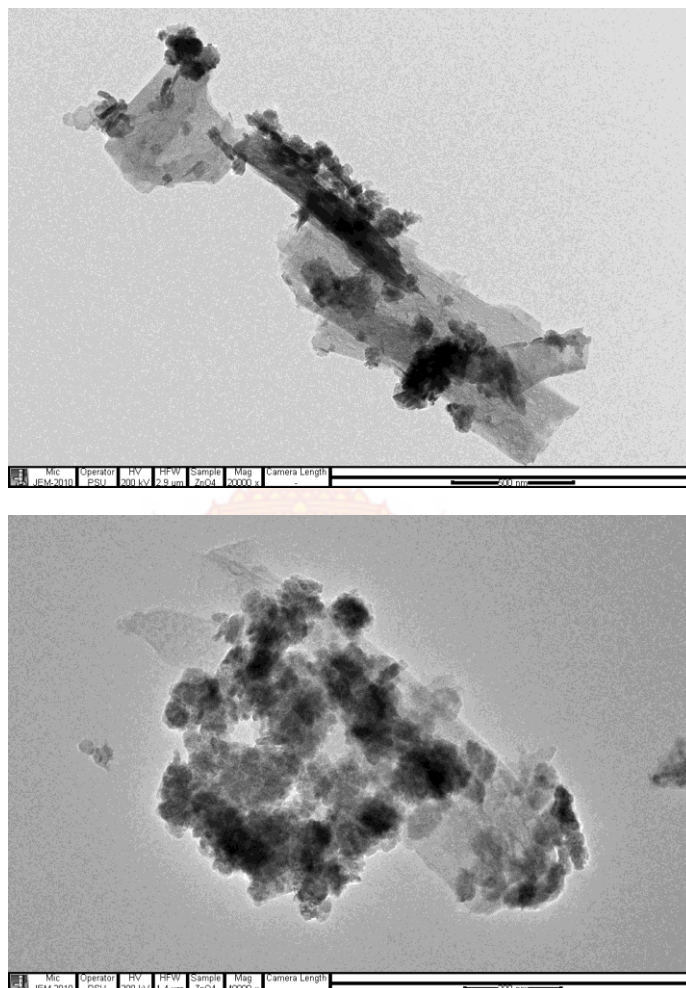


รูปที่ 3.5 ภาพถ่าย FE-SEM EDS mapping ของสารอนุภาคนาโนซิงค์ ZnO NPs-04

จากรูปที่ 3.5 แสดงถึงธาตุองค์ประกอบในตัวอย่างของสารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ ZnO NPs-04 ยืนยันถึงการมี ZnO อยู่ในตัวอย่างของสารสกัดหยาบ และยังพบ Na ซึ่งอาจหลงเหลือมาจากขั้นตอนการสังเคราะห์ที่ใช้สารละลาย NaOH เพื่อตกผลึกของ ZnO ในระบบ

### 3.3.4 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope : TEM)

เป็นการศึกษารายละเอียดภายในของสารตัวอย่าง แสดงผลการทดลองดังรูปที่ 3.6

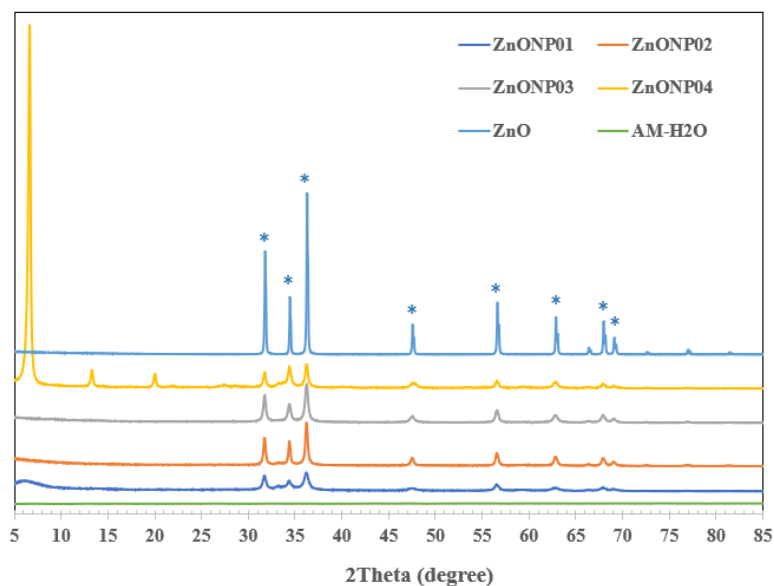


รูปที่ 3.6 ภาพถ่าย TEM ของตัวอย่างสารอนุภาคนาโนซิงค์ ZnO NPs-04 ที่กำลังขยาย x30000

รูปที่ 3.6 แสดงให้เห็นถึงผลึกของ ZnO ที่มีลักษณะเป็นแท่งรูปทรงสามมิติเกาะบนสารสกัด ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นบางซ้อนกัน

### 3.3.5 การวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (X-ray Diffractometer: XRD)

เป็นเทคนิคที่มีการนำรังสีเอ็กซ์ (X-ray) มาวิเคราะห์และระบุชนิดสารประกอบ โครงสร้างผลึกของสารประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง ทั้งในเชิงคุณภาพ (qualitative) และเชิงปริมาณ (quantitative) แสดงผลการทดลองดังรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 แสดง XRD spectra ของตัวอย่าง ZnO NPs-01, ZnO NPs-02, ZnO NPs-03, ZnO NPs-04, ZnO และสารสกัดหยาบเหง้าอุนป่า AM01 (AM H<sub>2</sub>O)

จากรูปที่ 3.7 เส้นสเปกตรัม XRD ของสารสกัดหยาบเหง้าอุนป่า AM01 (AM H<sub>2</sub>O) มีลักษณะเป็นอสัณฐาน ซึ่งตรงสอดคล้องกับผลของ FE-SEM ที่แสดงลักษณะเป็นก้อนพื้นผิวค่อนข้างเรียบขนาดใหญ่ ไม่มีรูปแบบผลึก ส่วนสเปกตรัม XRD ของ ZnO มีรูปแบบผลึกชัดเจนสอดคล้องกับฐานข้อมูล JCPD No. 01-079-5604 ซึ่งยืนยันโครงสร้างของ ZnO ที่มีระบบผลึกแบบ hexagonal ส่วนสเปกตรัม XRD ของสารตัวอย่างที่สังเคราะห์ได้ของ ZnO NPs01, ZnO NPs-02, ZnO NPs-03, ZnO NPs-04 ยืนยันถึงการมีโครงสร้างของ ZnO ที่มีระบบผลึกแบบ hexagonal ทั้งสิ้น แต่ความสูงของเส้นสเปกตรัมของสารตัวอย่างที่สังเคราะห์ได้นั้นต่ำ เนื่องจากการมีส่วนผสมของสารสกัดหยาบในขั้นตอนการสังเคราะห์ ส่งผลให้เกิดผลึกของ ZnO เกิดได้ไม่ดีเท่า ZnO อย่างเดียว แต่เนื่องจากผู้วิจัยต้องการพัฒนาคุณสมบัติในการยับยั้งอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบร่วมกับ ZnO ซึ่งการมี ZnO ร่วมกับสารสกัดหยาบจากเหง้าอุนป่าที่สกัดโดยด้วยตัวทำละลายที่เป็นน้ำ หรือเมทานอล พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดโดยใช้สารละลายเมทานอลจะแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรียได้สูงกว่ากรณีใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย โดยเฉพาะในกรณีของตัวอย่าง ZnO NPs-04 แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* ได้สูงสุดในกลุ่ม ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานส่งเสริมกันของตัวสารสกัดหยาบเหง้าอุนป่าและ ZnO ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียนั่นเอง

### 3.4 ศึกษาพฤติกรรมการดักจับอนุมูลอิสระของวัสดุนาโนซิงค์ออกไซด์ด้วยวิธี DPPH กับ ABTS

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Seethalaxmi และคณะ (2012) และวิธี ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) โดยใช้ BHT (Butylated hydroxy toluene) และกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid: Vit C) เป็นสารมาตรฐาน ผลการทดลองเมื่อนำสารสกัดงุ่นป่าและอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ มาตรวจสอบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ ABTS แสดงดังตารางที่ 3.2

**ตารางที่ 3.2** ร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระของสารสกัดงุ่นป่าและสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี DPPH และ ABTS

ตัวอย่าง	ร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระ	
	โดยวิธี DPPH	โดยวิธี ABTS
AM01	44.74 ± 0.51 <sup>d</sup>	98.20 ± 0.37 <sup>b</sup>
AM02	81.95 ± 1.06 <sup>c</sup>	99.46 ± 0.51 <sup>a</sup>
BHT	87.52 ± 0.03 <sup>b</sup>	99.32 ± 0.74 <sup>a</sup>
Vit C	95.59 ± 0.83 <sup>a</sup>	99.76 ± 0.22 <sup>a</sup>

หมายเหตุ: ทำการทดลอง 3 ซ้ำ; ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน; <sup>a-k</sup> ตัวเลขที่มีอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ); AM01 = สารสกัดงุ่นป่าด้วยตัวทำละลายน้ำ; AM02 = สารสกัดงุ่นป่าด้วยตัวทำละลายเมทานอล; BHT = Butylated Hydroxytoluene; Vit C = Ascorbic acid

**ตารางที่ 3.3** ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระของสารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่เตรียมได้เทียบกับสารทางการค้า ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี DPPH และ ABTS

ตัวอย่าง	ร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระ	
	โดยวิธี DPPH	โดยวิธี ABTS
ZnOAc	2.17 ± 0.98 <sup>f</sup>	7.54 ± 1.70 <sup>e</sup>
ZnO	10.90 ± 2.03 <sup>e</sup>	19.18 ± 0.92 <sup>d</sup>
ZnO NPs-01	76.11 ± 0.24 <sup>c</sup>	41.14 ± 0.89 <sup>b</sup>
ZnO NPs-02	52.80 ± 0.45 <sup>d</sup>	37.15 ± 0.46 <sup>c</sup>
ZnO NPs-03	78.30 ± 0.44 <sup>b</sup>	42.21 ± 0.95 <sup>b</sup>
ZnO NPs-04	83.71 ± 0.88 <sup>a</sup>	75.07 ± 0.93 <sup>a</sup>

หมายเหตุ: ทำการทดลอง 3 ซ้ำ; ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน; <sup>a-k</sup> ตัวเลขที่มีอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



จากตารางที่ 3.2 สารสกัดเหง้าอุนป่าจากตัวทำละลายเมทานอล ให้อัตราการดักจับอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัดเหง้าอุนป่าจากตัวทำละลายน้ำ และดีพอๆกับสารมาตรฐาน BHT แต่ดีน้อยกว่ากรดแอสคอร์บิก เมื่อพิจารณาข้อมูลจากตารางที่ 3.3 พบว่าเมื่อทดสอบการดักจับอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH สารตั้งต้นของซิงค์ อะซีเตต (ZnOAc) มีร้อยละของการดักจับอนุมูลอิสระน้อยที่สุด ขณะที่เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระของซิงค์ออกไซด์ทางการการค้า (ZnO) กับสารอนุภาคนาโนซิงค์ ที่เตรียมผ่านปฏิกิริยาการรีดิวซ์โลหะด้วยสารสกัด พบว่าอนุภาคนาโน ZnO NPs-04 ดักจับอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ZnO NPs-03, ZnO NPs-01 และ ZnO NPs-02 ตามลำดับ ร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระที่ดี เป็นผลเนื่องจากการมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติ เช่นฟีนอลิกในปริมาณมาก ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากตารางที่ 3.1 ที่สารสกัดเหง้าอุนป่าจากตัวทำละลายเมทานอล (AM02) มีปริมาณสารฟีนอลิกสูงกว่าสารสกัดเหง้าอุนป่าจากตัวทำละลายน้ำ (AM01) ดังนั้นสารอนุภาคนาโนซิงค์ที่เตรียมจากสารสกัดดังกล่าวจึงมีสมบัติในการดักจับอนุมูลอิสระได้ดีกว่าด้วยเช่นกัน เชื่อว่าหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของสารประกอบฟีนอลิก ดักจับอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ได้มาก ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสารสำคัญที่มีประสิทธิภาพนี้ต้องมีขั้วสูงเช่นเดียวกับขั้วของตัวทำละลายเมทานอลที่ใช้สกัด ตามหลักของ like dissolve like

**3.5 ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดเหง้าอุนป่าและสารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่ผลิตได้ โดยวิธี disc diffusion และการตรวจสอบประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้จากการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC/MBC)**

นำสารตั้งต้น ZnO,  $[Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O]$  (ZnOAc), AM01 และ AM02 ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) และแกรมบวก (*S. aureus*) เทียบกับสารอนุภาคนาโนที่เตรียมได้ 4 ชนิดคือ ZnO NPs-01, ZnO NPs-02, ZnO NPs-03, ZnO NPs-04 ซึ่งเชื่อดังกล่าวได้จากศูนย์จุลินทรีย์ ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ (ศคช.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ทดสอบโดยวิธี disc diffusion ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.4-3.7

**ตารางที่ 3.4** ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* ของสารตั้งต้นเทียบกับ ZnO NPs-01 และ ZnO NPs-02

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (มิลลิเมตร)		มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	MIC	MBC
ZnO	6.00	0.00	20	> 20
ZnOAc	8.56	0.15	20	> 20
AM01	6.26	0.07	20	> 20
ZnO NPs-01	6.14	0.02	20	> 20
ZnO NPs-02	6.09	0.01	20	> 20
Gentamycin	22.17	0.82	-	-

หมายเหตุ: ทำการทดลอง 3 ซ้ำ; MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้; MBC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้

**ตารางที่ 3.5** ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* ของสารตั้งต้นเทียบกับ ZnO NPs-03 และ ZnO NPs-04

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (มิลลิเมตร)		มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	MIC	MBC
ZnO	6.00	0.00	20	> 20
ZnOAc	8.65	0.27	20	> 20
AM02	7.03	0.08	20	> 20
ZnO NPs-03	6.35	0.06	10	> 20
ZnO NPs-04	6.69	0.26	10	> 20
Gentamycin	22.48	0.55	-	-

หมายเหตุ: ทำการทดลอง 3 ซ้ำ; MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้; MBC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้

จากตารางที่ 3.4 สารอนุภาคนาโนซิงค์ ZnO NPs-01 และ ZnO NPs-02 ออกฤทธิ์ได้ดีพอๆ กับ ZnO ทางการค้า แต่น้อยกว่าสารตั้งต้น  $[Zn(OAc)_2] \cdot 2H_2O$  (ZnOAc) และ AM01 ขณะที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้เพื่อยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียมีค่าเท่ากัน เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ > 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากตารางที่ 3.5 สารอนุภาคนาโนซิงค์ ZnO NPs-03 และ ZnO NPs-04 ออกฤทธิ์ได้ดีกว่า ZnO ทางการค้า แต่น้อยกว่าสารตั้งต้น  $[Zn(OAc)_2] \cdot 2H_2O$  (ZnOAc) และ AM02 ขณะที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้เพื่อยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียมีค่าเท่ากัน เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ > 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

**ตารางที่ 3.6** ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* ของสารตั้งต้นเทียบกับ ZnO NPs-01 และ ZnO NPs-02

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (มิลลิเมตร)		มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร
	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	MIC	MBC
ZnO	7.99	0.15	0.0313	> 20
ZnOAc	9.82	0.33	2.5	> 20
AM01	7.54	0.3	20	> 20
ZnO NPs-01	7.75	0.05	10	> 20
ZnO NPs-02	7.06	0.14	10	> 20
Gentamycin	25.71	0.38	-	-

หมายเหตุ: ทำการทดลอง 3 ซ้ำ; MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้; MBC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้

**ตารางที่ 3.7** ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* ของสารตั้งต้นเทียบกับ ZnO NPs-03 และ ZnO NPs-04

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (มิลลิเมตร)		มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร
	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	MIC	MBC
ZnO	8.06	0.24	0.0313	> 20
ZnOAc	10.12	0.38	2.5	> 20
AM02	9.14	0.40	20	> 20
ZnO NPs-03	8.25	0.05	10	> 20
ZnO NPs-04	8.10	0.09	5	> 20
Gentamycin	25.72	0.72	-	-

หมายเหตุ: ทำการทดลอง 3 ซ้ำ; MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้; MBC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้

จากตารางที่ 3.6 สารอนุภาคนาโน ZnO NPs-01 ออกฤทธิ์ได้ดีพอๆ กับ ZnO ทางการค้า และ AM01 แต่น้อยกว่าสารตั้งต้น  $[Zn(OAc)_2] \cdot 2H_2O$  (ZnOAc) ขณะที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้เพื่อยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียมีค่าเท่ากัน ซึ่งเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ > 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากตารางที่ 3.7 สารอนุภาคนาโน ZnO NPs-03 และ ZnO NPs-04 ออกฤทธิ์ได้ดีกว่า ZnO ทางการค้า แต่น้อยกว่าสารตั้งต้น  $[Zn(OAc)_2] \cdot 2H_2O$  (ZnOAc) และ AM02 นอกจากนี้เป็นที่น่าสนใจว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้เพื่อยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียของสาร ZnO NPs-04 มีค่าเท่ากัน

เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ > 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าอนุภาคนาโนทั้ง 4 ชนิดคือ ZnO NPs-01, ZnO NPs-02, ZnO NPs-03 และ ZnO NPs-04 ยับยั้งเชื้อก่อโรค *E. coli* ได้ดีพอกัน ต่างจากเชื้อ *S. aureus* ที่สาร ZnO NPs-04 ยังยับยั้งเชื้อก่อโรคชนิดนี้ได้ดีที่สุดใน

การออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งแกรมลบและแกรมบวก (*E. coli* และ *S. aureus*) ของสารอนุภาคนาโนซิงค์ที่เตรียมได้ มีผลมาจากสารเมทาบอลไลต์ทุติยภูมิเช่นฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ที่เกิดพันธะกับโลหะซิงค์ดังปรากฏ และการยับยั้งเชื้อก่อโรคจากการเกิดโซนาไรเซชันจากสารสกัดเหง้าอู๋งุ่นป่า (AM01 และ AM02) นอกจากสารเมทาบอลไลต์ที่กล่าวไปข้างต้น เป็นไปได้ว่ายังมีสารอื่นเป็นองค์ประกอบในสารสกัด ที่ส่งผลต่อการเกิดพันธะกับโลหะอีกเช่น แอลคาลอยด์ เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน หรือแม้กระทั่งโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นไปได้ว่าทั้งหมดนี้จะส่งผลต่อความสามารถในการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียได้ นอกจากนี้ยังมีการรายงานสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ของแบคทีเรีย (Ravikumar and Kathiresan, 1993; Scalbert, 1991) จากข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการทดลองและการค้นคว้าข้อมูล เป็นไปได้ว่าสารอนุภาคนาโนซิงค์ที่มีสารสกัดเหง้าอู๋งุ่นป่าเป็นตัวรีดิวซ์ มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* และ *S. aureus*

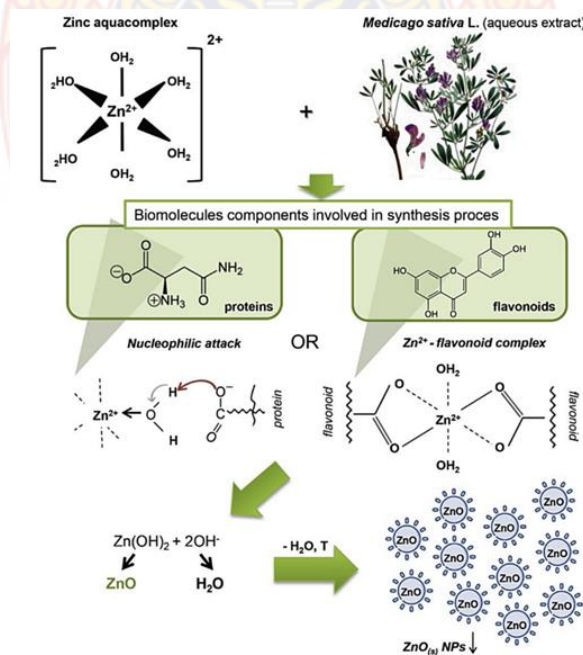


## บทที่ 4

### สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

#### 4.1 สรุปผล

เตรียมสารสกัดเหง้าองุ่นป่า (*Ampelocissus martini*) กับตัวทำละลายน้ำ และตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิกกับฟลาโวนอยด์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณโดยวิธีทางเคมีคือ Folin ciouteu และ Aluminium Chloride ตามลำดับ เปรียบเทียบกับสารสกัดเหง้าองุ่นป่าซึ่งได้จากตัวทำละลายเมทานอล (ลักษณะ และคณะ, 2560) พบว่าทั้งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ มีในสารสกัดเมทานอลในปริมาณมากกว่า นอกจากนี้สารสกัดยังมีสารเมทาบอลิต์ทุติยภูมิอื่นๆ เป็นองค์ประกอบอีกเช่น แอลคาลอยด์ ซาโปนิน แทนนิน (ลักษณะ และคณะ, 2560) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์และตัวคงสภาพที่ดี (Khandel และคณะ 2018) จากนั้นนำสารสกัดเหง้าองุ่นป่าจากตัวทำละลายน้ำ (AM01) และสารสกัดเหง้าองุ่นป่าจากตัวทำละลายเมทานอล (AM02) ทำปฏิกิริยากับซิงค์ อะซีเตต  $[Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O]$  จะได้สารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ ทั้งหมด 4 ชนิดคือ ZnO NPs-01, ZnO NPs-02, ZnO NPs-03 และ ZnO NPs-04 ซึ่งสารเมทาบอลิต์ในสารสกัดจะทำปฏิกิริยากับโลหะไอออน ( $Zn^{2+}$ ) มีกลไกการเกิดปฏิกิริยาของอนุภาคซิงค์นาโนกับสารสกัดพืช ซึ่งนำเสนอโดย Król และคณะ (2019) ดังรูป



ที่มา: Król และคณะ 2019

นอกจากนี้ตรวจสอบลักษณะโครงสร้างโดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี พบว่าทั้งสารสกัดและสารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์มีแถบการดูดกลืนของวงแหวนฟีนอลซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดในช่วง  $3200-3400\text{ cm}^{-1}$  เป็นแถบการยืดของ O-H และเลื่อนไปทางที่มีความยาวคลื่นมากขึ้นสนับสนุนการเกิดเป็นสารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ และแถบการดูดกลืนที่เลขคลื่นในช่วง  $400-600\text{ cm}^{-1}$  สนับสนุนการเกิดพันธะของโลหะซิงค์กับออกซิเจน

นอกจากนี้ตรวจสอบพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พร้อมทั้งระบุชนิดของสารประกอบโดยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (XRD) พบว่าพื้นผิวของสารสกัดค่อนข้างเรียบและไม่มีรูปแบบผลึก มีลักษณะเป็นอสัณฐานสอดคล้องกับผลของ FE-SEM และต่างจากสารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ที่เตรียมได้ที่มีลักษณะสัณฐานเป็นอนุภาคนาโนขนาดเล็กเกาะกันเป็นกลุ่ม สนับสนุนจากภาพถ่ายจาก FE-SEM EDS mapping และ TEM อีกทั้งผลที่ได้สอดคล้องกับผลของเทคนิค XRD ที่มีโครงสร้างของ ZnO ในตัวอย่างทั้ง 4 ชนิดของ ZnO NPs-01, ZnO NPs-02, ZnO NPs-03, ZnO NPs-04 และมีระบบผลึกแบบ hexagonal เมื่อเทียบสเปกตรัมกับ ZnO ทางการค้า และเมื่อนำสารสกัดและสารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์มาทดสอบการดักจับอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และวิธี ABTS พบว่าสารสกัดแห้งจากตัวทำละลายเมทานอล เตรียมเป็นสารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ (ZnO-NPs-04) ที่มีสมบัติในการดักจับอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด สอดคล้องกับการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 2 ชนิด คือ *E.coli* และ *S. aureus* โดยให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่  $10 / >20$  และ  $5 / >20$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับเชื้อ *E.coli* และ *S. aureus* ตามลำดับ

ดังนั้นจากการทดลองสรุปได้ว่าสารสกัดแห้งจากปามีสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์โลหะไอออนซิงค์ ได้สารอนุภาคนาโนที่มีเสถียรภาพ และได้สารอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ ZnO-NPs-04 นี้ที่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด

## 4.2 ข้อเสนอแนะ

4.2.1 ศึกษาการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีเพื่อหาโครงสร้างสารบริสุทธิ์ และนำมาศึกษากลไกการเกิดปฏิกิริยาของโลหะไอออนกับสารที่ทำหน้าที่รีดิวซ์โลหะไอออน

4.2.2 ศึกษาสารอนุภาคนาโนโลหะซิงค์ออกไซด์กับสารสกัดพืชชนิดอื่นเพื่อเปรียบเทียบ และนำข้อมูลองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นอธิบายการออกฤทธิ์ของสารต่อการดักจับอนุมูลอิสระและการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เป็นการเพิ่มองค์ความรู้ต่อยอดงานวิจัยและเป็นประโยชน์ต่อผู้ค้นคว้าศึกษาการทดลอง ถือเป็นนวัตกรรมองค์ความรู้ได้ต่อไป

### เอกสารอ้างอิง

การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม. สำนักพิมพ์สุขไพศาล. กรุงเทพมหานคร. 96 น.

บรรจง เทียนส่งรัมย์. 2552. ปูแสม...กำลังวิกฤติ ร่วมคิดร่วมเลี้ยงปู ดูแลป่า แก้ปัญหา พัฒนาป่าชุมชน. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) กรุงเทพฯ. 104 หน้า

ณัฐรัตน์ ปภาวสิทธิ์ วรินทร์ ชวศิริ วิโรจน์ ชินธนาธร. 2555. หนังสือพรรณไม้สมุนไพรในป่าชายเลน บ้านทุ่งตะแจะ จังหวัดตรัง. พิมพ์ครั้งที่ 1. ห้างประสุขชัยการพิมพ์.

ธีรวุฒิ เลิศสุทธิขวาล. พิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบจากพืชป่าชายเลนบางชนิดต่อปลา นิล (*Oreochromis niloticus*) ที่เลี้ยงในน้ำกร่อย. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง 4(1): 120 – 130 .

ลักขมี วิทยา และ ชาศรียา ฉลาด. 2558. ผลของตัวทำละลายต่อฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดป่าชายเลน. **รายงานการวิจัย**. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย, ตรัง. 40 น.

วัลลภ วิชะรังสรรค์และปราณีต โอปณะโสภิต. ภาพรวมของอนุมูลอิสระและการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชในหลอดทดลอง. **วารสารศรีนครินทร์วิโรฒเภสัชสาร**. 9(1): 73-80. พฤศจิกายน 2547.

วัลลักรุกขบุปผชาติ ตามรอยพระบาทบรมราชกุมารี, 2552

เวียง เชื้อโพหัก. 2543. โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์น้ำ. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 168-171

พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และ ปารีชาติ พุ่มขจร. 2553. การใช้สมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรคในปลา. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**. 12(4): 63-71.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์และ นิธิยา รัตนาปนนท์. ม.ป.ป. Phenolic compounds /สารประกอบฟีนอล. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:<http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2585/phenolic-compound>. (30 พฤษภาคม 2560).

สารภีทะเล [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=116>, 17 กรกฎาคม 2561

สิทธิโชค จันทร์ยอง. 2552. พันธุ์ไม้ป่าชายเลนและป่าชายหาดชายฝั่งอ่าวสิเกา จังหวัดตรัง. นีโอพ้อยท์. 138 น.

Abey singhe, P.D . 2010. Antibacterial activity of some medicinal mangroves against Antibiotic resistant pathogenic bacteria. *Indian J. Pharm. Sci.* 72(2): 167-172 .

Anonymous. 2016. [http://tanhakit.blogspot.com/2010/12/blog-post\\_865.html](http://tanhakit.blogspot.com/2010/12/blog-post_865.html) : August 14 2016.

Banerjee, D., Chakrabarti, S., Hazra, A.K., Banerjee, S., Ray, J. and Mukerjee, B. 2008. Antioxidant activity and total phenolic of some mangrove in Sunderbans. *African Journal of Biotechnology*. 7(6): 805-810.

Bhuvanewari, R., Xavier, R.J. and Arumugam, M. 2015. Biofabrication and its *in vitro* toxicity mechanism of silver nanoparticles using *Bruguiera cylindrical* leaf extract. *Karbala International Journal of Modern Science*. 1: 129-134.

Chen, S. N., Huang, S. L. and Kou, G. H. 1992. Studies on the epizootiology and pathogenicity of bacterial infections in cultured giant tiger prawns, *Penaeus monodon*, in Taiwan. In Fulks, W. and Main, K. L., eds. Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States Hawaii. 195-205.

Citarasu, T. 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*. 18(3): 403-414.



- Das, S.K., Samantaray, D. and Thatoi, H. 2017. UV Evaluation of In vitro antidiabetic and antioxidant activities and preliminary phytochemical screening of leaf extracts of *Avicennia officinalis*. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine* 9(4): 173-176.
- Kassim, M. J., Hussin, H., Achmad, A., Dahon, N. H., Suan, K., Ham, H. S. 2011. Determination of total phenolic, condensed tannin and flavonoid contents and antioxidant activity of *gambir* extract. *Majalah Farmasi Indonesia* 22(1): 50-59.
- Loder, J.W. and Russell, G.B. 1969. Tumor inhibition plants. The alkaloid of *Bruguiera sexangula* and *Bruguiera exaristata* (Rhizophoraceae). *Australian Journal of Chemistry*. 22: 1271-1274.
- Manilal, A., Tsalla, T., Ameya, G., Merdekios, B. and John, S. E. 2016. Evaluating the antibacterial and anticandidal potency of mangrove, *Avicennia marina*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 6(2): 136-140.
- National Committee for Clinical Laboratory Standard. 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 8<sup>th</sup> Informational supplement. NCCLS document M100-S9.
- Premanathan, M., Arakaki, R., Izumi, H., Kathiresan, K., Nakano, M., Yamamoto, N. and Nakashima, H. 1999. Antiviral properties of a mangrove plant, *Rhizophora apiculata* Blume, against immunodeficiency virus. *Antivir. Res.* 44 : 113-122 .
- Poojary, M.M., Vishnumurthy, K.A. and Adhikari, A.V. 2015. Extraction, characterization and biological studies of phytochemicals from *Mammea suriga*. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 5(3): 182-189.

- Rahim, A.A., Rocca, E., Steinmetz, J., Jain Kassim, M., Sani Ibrahim, M. and Osman, H. 2008. Antioxidant activities of mangrove *Rhizophora apiculata* bark extracts. *Food Chemistry*. 107(1) : 200-207.
- Rastogi, R. P. and Mehrotra, B. N. 1991. Compendium of Indian medicinal plants. Publications & Information Directorate. New Delhi 1.
- Ruangpan, L., Tabkaew, R., and Sangrungruang, K. 1995. Bacterial flora of ponds with different stocking densities of black tiger shrimp *Penaeus monodon*, In **Fisheries Health Section Asian, Fisheries Soc.** Manila, Philippines. 141-149.
- Shokita, S., 2004. The role of aquatic animals in mangrove ecosystem. In Vannucci, M. (ed.), *Mangrove management and conservation*, United nation university press, New York, USA. Pp 76-110.
- Tiwari, P., Tamrakar, A.K., Ahmad, R., Srivastava, M.N., Kumar, R., Lakshmi, V. and Srivastava, A.K. 2008. Antihyperglycaemic activity of *Cerios tagal* in normoglycaemic and streptozotocin –induced diadetic rats. *Med Chem Res*. 17: 74-84.
- Thongtham, N., and Kristensen, E. 2005. Carbon and nitrogen balance of leaf-eating sesamid crabs (*Neopisesarma versicolor*) offered different food sources. *Estuarine, coastal and shelf science*. 65: 213-222.
- Susanto, D.-F., Aparamarta, H.-W., Widjaja, A. and Gunawan, S. 2017. Identification of phytochemicals in *Calophyllum inophyllum* leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 7(9): 773-781.
- Vittaya, L., Chalad, C., Khongsai, S. and Ritthiwigrom, T. 2014. Phytochemical Screening, Total phenolic Content, and Antibacterial activity of *Derris trifoliata* extracts. *Thai Journal of Botany*, 6(special Iss): 109-115.

Vittaya, L. and Chalad, C. 2016. "Effect of Solvents on Phytochemical Analysis and Antibacterial Activity of Leaf and Bark Extracts from *Rhizophora apicalata*", RMUTSV Research Journal 8(1): 31-38.

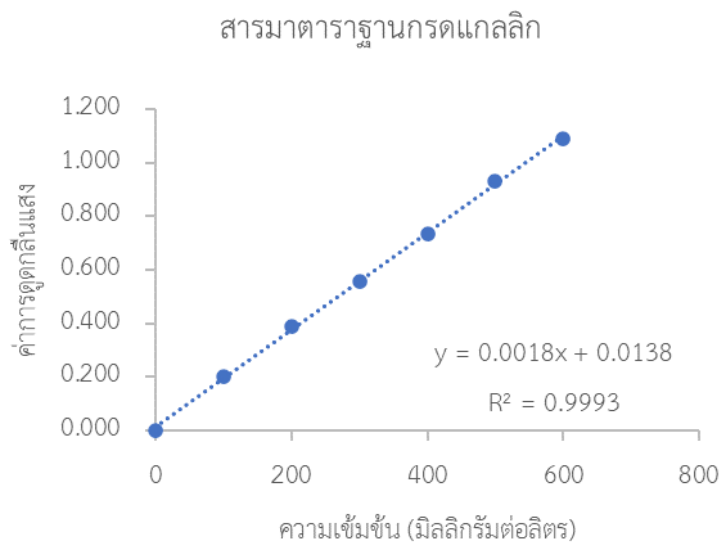




ภาคผนวก

### ภาคผนวก ก

#### ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสารสกัดเหง้าอุงุ่นป่า



ภาพผนวก ก1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

ตารางผนวก ก1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเหง้าอุงุ่นป่าแห่งที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเมทานอล ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

สารสกัด	ตัวทำละลาย	ความยาวคลื่นที่ 765 nm			ค่าเฉลี่ย	SD
		1	2	3		
เหง้าอุงุ่นป่า	น้ำ	0.564	0.586	0.575	0.575	0.011
	เมทานอล	0.922	0.965	0.982	0.956	0.031

#### ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

1. การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากส่วนเถาอุงุ่นป่าในตัวทำละลายเฮกเซน

$$\text{จากสมการ} \quad x = \frac{(y - 0.0138)}{0.0018}$$

$$\text{แทนค่า} \quad y = 0.564$$

$$x = \frac{(0.564 - 0.0138)}{0.0018}$$

$$x = 305.667$$

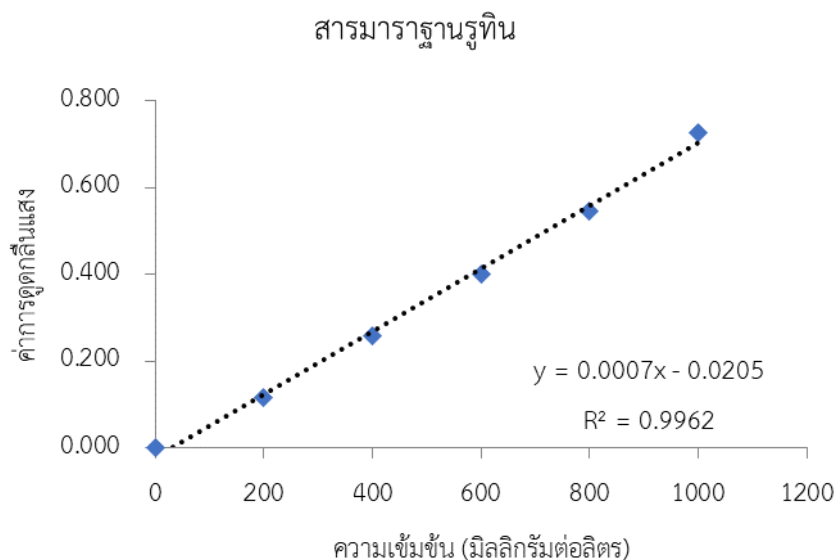
ในส่วนสารสกัดแห้งอ่อนป่าที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณสารฟีนอลิกเท่ากับ 305.667 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อ 0.1 มิลลิกรัมสารสกัดหยาบ

• ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก =  $305.667 \times 10 = 3056.67$  ไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ หรือเท่ากับ 3.057 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ



### ภาคผนวก ข

#### ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สารสกัดเหง้าอุงุ่นป่า



ภาพผนวก ข1 กราฟมาตรฐานรูทีน แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

ตารางผนวก ข1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเหง้าอุงุ่นป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเมทานอล ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

สารสกัด	ตัวทำละลาย	ความยาวคลื่นที่ 765 nm			ค่าเฉลี่ย	SD
		1	2	3		
เหง้าอุงุ่นป่า	น้ำ	0.216	0.220	0.197	0.211	0.012
	เมทานอล	0.771	0.712	0.781	0.755	0.037

#### ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

1. การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดเหง้าอุงุ่นป่าในส่วนเหง้าอุงุ่นป่าในตัวทำละลายเฮกเซน

$$\text{จากสมการ} \quad x = \frac{(y + 0.0205)}{0.0007}$$

แทนค่า  $y = 0.216$

$$x = \frac{(0.216 + 0.0205)}{0.0007}$$

$$x = 337.857$$

ในส่วนสารสกัดเหง้าอุนป่าที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 337.857 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อ 0.1 มิลลิกรัมสารสกัดหยาบ

• ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก =  $337.857 \times 10 = 3378.571$  ไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ หรือเท่ากับ 3.379 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ

